



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Radiosynthese, Formulierung und Qualitätskontrolle
von [^{18}F]Altanserin für die Bildgebung des 5-HT_{2A}-
Rezeptors“

Verfasserin

Sandra Richter

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, März 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

O. Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die an der Durchführung dieser Diplomarbeit beteiligt waren.

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei O. Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Diplomarbeit am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie durchführen zu können.

Mein Dank geht an O. Univ. Prof. Dr. Robert Dudczak und Univ. Prof. DDr. Kurt Kletter für die Möglichkeit, die notwendigen praktischen Arbeiten in den Labors der Universitätsklinik für Nuklearmedizin am AKH Wien verrichten zu können.

Des Weiteren möchte ich mich bei Doz. Wolfgang Wadsak und Doz. Markus Mitterhauser für die fachliche Beratung und Unterstützung während der gesamten Arbeitszeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Mag.^a Johanna Ungersböck für ihre kompetente Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Geduld, meine vielen Fragen zu beantworten.

Bei der Arbeitsgruppe der Nuklearmedizin (Dr.ⁱⁿ Daniela Häusler, Mag. Lukas Nics, Mag.^a Cécile Philippe, und B.Sc. Markus Zeilinger) möchte ich mich herzlich für das angenehme Arbeitsumfeld und die Möglichkeit, neben meiner Diplomarbeit auch Einblicke in andere Forschungsbereiche erlangen zu können, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir dieses Studium durch ihre finanzielle und persönliche Unterstützung all die Jahre hinweg ermöglicht haben.

Zusammenfassung

Serotonin ist ein Neurotransmitter, der im Zentralnervensystem (ZNS), im Darmnervensystem, im Blut und im Herz-Kreislauf-System vorkommt und dort sowohl physiologische als auch pathophysiologische Wirkungen ausübt. [^{18}F]Altanserin, ein spezifischer Antagonist des Serotonin-Rezeptors vom Subtyp 5-HT_{2A}, ist ein wichtiger PET-Tracer für die Darstellung und Quantifizierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors im menschlichen Gehirn und wurde bereits im Rahmen mehrerer klinischen Studien erfolgreich angewendet.

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich zunächst mit der radiochemischen Synthese von [^{18}F]Altanserin aus der Vorstufe Nitroaltanserin (=Precursor) mit Hilfe eines Mikrofluidsystems (Advion NanoTek[®] LF). Unter Veränderung von Precursor-Konzentration, Reaktionstemperatur, Durchflussgeschwindigkeit und Reaktionsvolumen wurden eine Vielzahl von Synthesen durchgeführt, um die optimalen Reaktionsparameter für eine größtmögliche Produktausbeute zu finden. Die höchste radiochemische Inkorporation von $42.2 \pm 16.4\%$ konnte mit einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL, einer Reaktionstemperatur von 220°C, einer Durchflussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einem Reaktionsvolumen von je 400 μL Precursor bzw. [^{18}F]Fluorid erzielt werden.

Nach Ermittlung der besten Reaktionsbedingungen für die Synthese von [^{18}F]Altanserin war es notwendig, das Produkt mittels präparativer HPLC zu isolieren und anschließend zu formulieren, um die Applikation an einem Patienten zu ermöglichen. Für die Erstellung eines guten HPLC-Assays ist es wichtig, dass das reine Syntheseprodukt nach möglichst kurzer Zeit von der präparativen Säule eluiert wird und dass die Durchflussgeschwindigkeit so niedrig wie möglich gehalten wird, um einen hohen Laufmittelverbrauch zu vermeiden. Zu diesem Zwecke wurden drei verschiedene präparative HPLC-Säulen in Kombination mit unterschiedlichen Laufmitteln mit Hilfe des Moduls GETracerlab F_XF_N getestet. Bedauerlicherweise konnte keine der untersuchten Säulen die erforderlichen Bedingungen für eine zeit- und kostensparende reine Produktisolierung erfüllen.

Nach der Formulierung des Produkts lag das reine [^{18}F]Altanserin in Lösung zusammen mit Natriumchlorid, Ethanol und Phosphatpuffer vor und könnte in weiterer Folge in dieser Form einem Patienten verabreicht werden. Zur Evaluierung der besten Parameter für eine optimale Produktausbeute wurde die Aufreinigung händisch durchgeführt. Sobald eine geeignete präparative HPLC-Säule zur Produktisolierung vorhanden

ist und ausgetestet wurde, wird dieser Arbeitsschritt mit Hilfe von Macros programmiert und kann damit direkt im Anschluss an die präparative HPLC-Auftrennung mit Hilfe des Moduls GETracerlab $F_X F_N$ erfolgen.

Abstract

Serotonin has different physiologic and pathophysiologic roles as a neurotransmitter in the central nervous system, the intestinal nervous system, the cardiovascular system and in the blood. [^{18}F]Altanserin, a specific antagonist of the 5-HT_{2A}-receptor, is an important PET-tracer for imaging and quantification of this receptor in the human brain and was already successfully used in many clinical studies.

The present diploma thesis is concerned about the synthesis of [^{18}F]Altanserin from its precursor Nitroaltanserin, which was performed on a microfluidic system named Advion NanoTek[®] LF. To determine the best reaction parameters for highest product yield, multiple syntheses were carried out varying precursor-concentration, reaction temperature, flow rate and reaction volume. The highest radiochemical incorporation yield of $42.2 \pm 16.4\%$ was obtained using 2 mg/mL precursor at 220°C reactor temperature and a flow rate of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ with a reaction volume of 400 μL precursor respectively [^{18}F]fluoride.

After the evaluation of the best reaction conditions for the synthesis of [^{18}F]Altanserin, it was necessary to perform a preparative HPLC purification of the product to allow the administration to a patient. For establishing a proper HPLC-assay, it is important to elute the pure product from the column after a short time and to keep the flow rate as low as possible to avoid using large amounts of HPLC solvent. Three different preparative HPLC-columns in combination with diverse solvents were analyzed using the semipreparative HPLC-system of the GETracerlab F_XF_N. Unfortunately, none of the investigated columns complied with the necessary conditions for a time-and-cost-effective product purification.

After the formulation of the product, [^{18}F]Altanserin was dissolved in a mixture of sodium chloride, ethanol and phosphate buffer to make it applicable for patients. To evaluate the best parameters for the synthesis, the formulation was performed manually. Once an adequate preparative HPLC-column for the purification is available, this step is programmed with macros and is performed after the preparative HPLC-purification on an automated platform.

INHALT

| | |
|---|-----------|
| 1 Allgemeiner Teil | 1 |
| 1.1 Eigenschaften und Chemie des Radionuklids Fluor-18 | 1 |
| 1.1.1 Herstellung von ^{18}F | 2 |
| 1.1.2 ^{18}F Markierungsmethoden | 3 |
| 1.1.2.1 Elektrophile (aromatische) Substitution | 4 |
| 1.1.2.2 Nukleophile Substitution | 4 |
| 1.1.3 Spezifische Aktivität von F-18 markierten Radiopharmaka | 5 |
| 1.1.4 ^{18}F als Radionuklid für PET-Radiopharmazeutika | 6 |
| 1.2 Anwendung von Mikroreaktoren zur Herstellung von Radiopharmaka | 7 |
| 1.2.1 Advion NanoTek [®] LF | 8 |
| 1.3 Biochemie, Physiologie und Pathophysiologie des serotonergen Systems | 11 |
| 1.3.1 Serotonin: Geschichte, Synthese und Vorkommen | 11 |
| 1.3.2 Physiologische Serotoninwirkungen | 12 |
| 1.3.3 Pathophysiologische Serotoninwirkungen | 12 |
| 1.3.4 Serotoninrezeptoren: Vorkommen, Effekte bei Stimulierung und therapeutisch eingesetzte Agonisten/Antagonisten | 13 |
| 1.3.4.1 5-HT ₁ -Rezeptoren | 14 |
| 1.3.4.2 5-HT ₂ -Rezeptoren | 15 |
| 1.3.4.3 5-HT ₃ -Rezeptoren | 16 |
| 1.3.4.4 5-HT ₄ -Rezeptoren | 16 |
| 1.3.4.5 5-HT ₅ -, 5-HT ₆ -, 5-HT ₇ -Rezeptoren | 16 |
| 1.3.5 Anwendung von PET-Tracern für die Diagnostik des serotonergen Systems | 17 |
| 1.3.6 [^{18}F]Altanserin: ein spezifischer Ligand des 5-HT _{2A} -Rezeptors | 17 |
| 2 Experimenteller Teil | 20 |
| 2.1 Radiosynthese von [^{18}F]Altanserin | 20 |
| 2.1.1 Materialien | 23 |
| 2.1.1.1 Materialien für die Synthese | 23 |
| 2.1.1.1.1 Chemikalien, Lösungen und Gase | 23 |
| 2.1.1.1.2 Gerätschaften | 23 |
| 2.1.1.2 Materialien für die Qualitätskontrolle | 24 |
| 2.1.1.2.1 Chemikalien, Lösungen und Gase | 24 |
| 2.1.1.2.2 Gerätschaften | 24 |
| 2.1.2 Methoden | 24 |
| 2.1.2.1 Vorbereitung des Advion NanoTek [®] LF für die Radiosynthese | 24 |
| 2.1.2.2 Produktion von [^{18}F]Fluorid mittels GE PETtrace Zyklotron | 26 |
| 2.1.2.3 Fixierung auf dem Anionentauscher, Elution und Azeotrope Trocknung | 26 |
| 2.1.2.4 Synthese: Praktische Durchführung der Optimierungsreaktionen mit einem Advion Nanotek [®] LF | 27 |
| 2.1.2.5 Erstellung eines Programms für den automatisierten Synthesablauf mittels Advion NanoTek [®] LF | 30 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1.2.6 | Qualitätskontrolle und Ermittlung der radiochemischen Inkorporation | 31 |
| 2.1.2.7 | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit verschiedener Reaktionsparameter | 33 |
| 2.1.3 | Ergebnisse..... | 35 |
| 2.1.3.1 | Precursor-Konzentration | 35 |
| 2.1.3.2 | Temperatur | 36 |
| 2.1.3.3 | Durchflussgeschwindigkeit (Flow) | 39 |
| 2.1.3.4 | Volumen..... | 41 |
| 2.1.3.5 | Weitere Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen | 47 |
| 2.1.3.5.1 | Synthese mit Rückschlagventil | 47 |
| 2.1.3.5.2 | Synthese mit Dimethylformamid (DMF) | 48 |
| 2.1.4 | Diskussion | 49 |
| 2.2 | Produktisolierung, Aufreinigung und Formulierung von [¹⁸F]Altanserin | 52 |
| 2.2.1 | Materialien | 54 |
| 2.2.1.1 | Materialien für die präparative HPLC | 54 |
| 2.2.1.1.1 | Chemikalien, Lösungen und Gase | 54 |
| 2.2.1.1.2 | Gerätschaften..... | 54 |
| 2.2.1.2 | Materialien für die Formulierung | 55 |
| 2.2.1.2.1 | Chemikalien und Lösungen | 55 |
| 2.2.1.2.2 | Gerätschaften..... | 55 |
| 2.2.1.3 | Materialien für die Qualitätskontrolle | 55 |
| 2.2.1.3.1 | Chemikalien und Lösungen | 55 |
| 2.2.1.3.2 | Gerätschaften..... | 55 |
| 2.2.2 | Methoden..... | 55 |
| 2.2.2.1 | Isolierung von [¹⁸ F]Altanserin mittels präparativer HPLC | 56 |
| 2.2.2.2 | Formulierung von [¹⁸ F]Altanserin | 57 |
| 2.2.2.3 | Qualitätskontrolle der geschnittenen und formulierten [¹⁸ F]Altanserin-Peaks.... | 58 |
| 2.2.3 | Ergebnisse..... | 61 |
| 2.2.3.1 | Methoden zur Entwicklung eines geeigneten HPLC-Assays | 61 |
| 2.2.3.1.1 | Versuche mit der präparativen HPLC-Säule Chromolith SemiPrep RP-18e | 61 |
| 2.2.3.1.2 | Versuche mit der präparativen Säule ProntoSIL 120 C18 | 66 |
| 2.2.3.1.3 | Versuche mit der präparativen Säule Gemini C18 | 67 |
| 2.2.4 | Diskussion | 68 |
| 3 | Zusammenfassung und Ausblick | 71 |
| A | Literaturverzeichnis | 73 |
| B | Abkürzungsverzeichnis | 79 |
| C | Abbildungsverzeichnis | 81 |
| D | Tabellenverzeichnis | 85 |

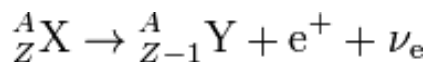
1 Allgemeiner Teil

1.1 Eigenschaften und Chemie des Radionuklids Fluor-18

Fluor-18 (^{18}F) ist eines der wichtigsten Radionuklide in der radiopharmazeutischen Produktion und wird vor allem zur radioaktiven Markierung von Radioliganden für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) verwendet. Dieses bildgebende Verfahren erlaubt es, die Verteilung eines Radiotracers abhängig von Funktionalität des Moleküls und des Gewebes im menschlichen Körper zu detektieren. Der Radiotracer (meist mit Fluor-18 markiert) wird dem Patienten appliziert und durch seinen Zerfall kann dessen Verteilung im Körper sichtbar gemacht werden.

^{18}F kann aus vielerlei Gründen als ideales Radionuklid für die Entwicklung von PET-Radiotracern angesehen werden.

^{18}F gehört zur Kategorie der β^+ -Strahler und weist eine maximale Energie von 649 keV auf. [1] Bei einem β^+ -Zerfall wird im Kern ein Proton in ein Neutron umgewandelt. Gleichzeitig entstehen dadurch ein hochenergetisches Positron (Antiteilchen eines Elektrons) und ein Elektron-Neutrino, die dann emittiert werden. Dabei verringert sich die Ordnungszahl des Kerns um einen Zähler, dessen Massenzahl bleibt unverändert. Die allgemeine Gleichung der Kernreaktion eines β^+ -Zerfalls lautet wie folgt:



Der Mutterkern X mit der Massenzahl A und der Ordnungszahl Z zerfällt unter Aussendung eines Positrons (e^+) und eines Elektronenneutrinos (ν_e) in den Tochterkern Y mit gleicher Massenzahl und um 1 verminderter Ordnungszahl. [2]

Bei einer Wechselwirkung des Positrons (e^+) mit einem Elektron (e^-) zerstrahlt es in zwei Photonen mit einer Energie von jeweils 511 keV in einem Winkel von 180° . Diese Eigenschaft wird als Annihilierungsstrahlung bezeichnet und wird bei der Positronen-Emissions-Tomographie ausgenutzt. [3, 4] Durch die vergleichsweise geringe β^+ -Energie von 649 keV können PET-Bilder mit höchster Qualität gemacht werden. [1]

Das Isotop ^{18}F hat eine Halbwertszeit von 109.7 Minuten. [5] Unter dem Begriff Halbwertszeit versteht man die Zeitspanne, in der die Menge und damit auch die Aktivität eines gegebenen Radionuklids durch dessen Zerfall auf die Hälfte gesunken ist. Das bedeutet, dass sich 50% der Atomkerne unter Aussendung von ionisierender Strahlung in ein anderes Nuklid umgewandelt haben, welches ebenfalls radioaktiv sein kann oder nicht. Für jedes Nuklid ist die Halbwertszeit eine feste Größe, die sich nicht (bzw. nur in

Ausnahmefällen geringfügig) beeinflussen lässt. [6] Die spezifische Aktivität ist jene Aktivität, die eine Stoffmenge pro Masseneinheit (Bq/mg bzw. Bq/mol) aufweist. [7] Aufgrund der Länge der Halbwertszeit (109.7 Min.) sind sowohl zeitintensive Radiosynthesen als auch PET-Studien von langsamen biochemischen Prozessen mit ^{18}F möglich.

Das Element Fluor hat die höchste Elektronegativität und kann daher leicht mit vielen organischen und anorganischen Molekülen reagieren. Die Tatsache, dass ein Fluor-Atom ungefähr der Größe eines Wasserstoff-Atoms entspricht, macht es möglich, dass ein Wasserstoff-Atom oder eine Hydroxylgruppe durch Fluor substituiert werden können, ohne dass sich die sterische Anordnung des Moleküls und somit auch die biologische Funktion im Körper gravierend ändert. [1, 8]

1.1.1 Herstellung von ^{18}F

Die Produktion des Isotops ^{18}F findet in einem Zyklotron statt und kann auf verschiedenen Wegen erfolgen.

Die Herstellung von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ ($[^{18}\text{F}]$) erfordert die Anwesenheit von ^{18}O -angereichertem Wasser als Target. Im Rahmen einer $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Reaktion wird im Zyklotron durch Bestrahlung von ^{18}O -angereichertem Wasser schlussendlich $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ mit hoher molarer Radioaktivität gewonnen. ^{18}O ist ein stabiles Isotop, das in der Natur zu 0.21% vorkommt (zum Vergleich: ^{16}O : 99.75%, ^{17}O : 0.04%). [1] Für die ^{18}F -Produktion ist eine ^{18}O -Anreicherung von mindestens 95% erforderlich, da sonst das natürlich vorkommende Element ^{16}O unter Bildung von unerwünschtem ^{13}N im Rahmen einer $^{16}\text{O}(\text{p},\alpha)^{13}\text{N}$ -Reaktion im Zyklotron reagiert. Da ^{13}N aufgrund seiner Halbwertszeit von knapp 10 Minuten rasch abgebaut wird und bei der ^{18}F -Radiosynthese ohnehin abgetrennt wird, ist dessen Produktion nur von geringer Bedeutung und stellt für die ^{18}F -Tracerherstellung kein Problem dar. $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ liegt nach seiner Produktion in wässriger Lösung in hydratisierter Form vor und ist somit für Reaktionen nicht zugänglich. Um $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ vom Wasser trennen zu können, behilft man sich einer Anionenaustauschersäule, welche $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ retiniert. Dieses wird anschließend mit Hilfe von Transferkatalysatoren von der Säule eluiert und in die organische Phase übergeführt. Durch azeotrope Trocknung kann das Wasser vollständig beseitigt werden. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode ist in Kapitel 2.1.2.3 zu finden.

Eine weitere Möglichkeit der ^{18}F -Produktion ist die Herstellung von gasförmigem Fluor

($[^{18}\text{F}]\text{F}_2$) über eine $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ -Reaktion oder eine $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Reaktion. Hierbei werden Neon-Gas bzw. Sauerstoff-Gas als Targets verwendet. Beide Produktionsmechanismen haben den Nachteil, dass das produzierte $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ an der Targetoberfläche absorbiert wird, wodurch das Zufügen von stabilem ^{19}F -Gas (0.1-2%) notwendig ist. Durch die „Verdünnung“ von ^{18}F mit ^{19}F ergibt sich eine niedrige spezifische Aktivität (ausgedrückt in GBq/ μmol) für $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Bei der Notwendigkeit von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ mit hoher spezifischer Aktivität startet die Produktion mit ^{18}O -angereichertem Wasser als Target. Anschließend wird das resultierende $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ über eine Reaktion mit Methyljodid in hoch aktives $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ umgewandelt. Dieser Schritt findet in einer Quartz-Entladungskammer statt, welche geringe Mengen an F_2 beinhaltet. [1] Diese Reaktion läuft folgendermaßen ab:

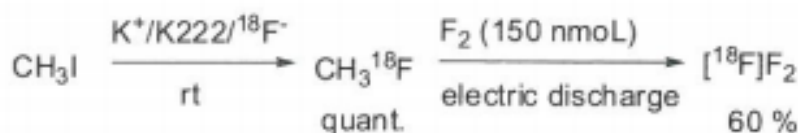


Abb. 1.1: Darstellung von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ über Methyljodid (CH_3I) [9]

Die Wahl der Produktionsmethode von ^{18}F ist davon abhängig, welche Methode zur Markierung von Substanzen mit ^{18}F angewendet werden soll.

1.1.2 ^{18}F Markierungsmethoden

Die Einbringung von Fluor-18 in ein organisches Molekül ist auf mehreren Wegen möglich. Eine Option wäre, das Isotop mit Hilfe von zwei verschiedenen Reaktionen in aromatische organische Strukturen einzubauen. Im Rahmen der Wallach-Reaktion werden dafür stabile Diazonium-Piperidine verwendet [10]; für die Balz-Schiemann-Reaktion werden Diazonium-Tetrafluorborate herangezogen. [11] Bei beiden Reaktionen wird die Diazonium-Einheit durch ^{18}F substituiert. Bei trägerfreien Synthesen führen beide Methoden zu geringen radiochemischen Ausbeuten. Da die Reaktionen nach dem $\text{S}_{\text{N}}1$ -Prinzip verlaufen, können durch die Begegnung von reaktiven Kationen mit nukleophilen Strukturen sehr leicht Nebenprodukte entstehen. Aufgrund dessen sind diese beiden Formen der ^{18}F -Markierung nicht die Methode der Wahl und werden daher durch Mechanismen der elektrophilen und nukleophilen Substitution ersetzt.

Die elektrophile Substitution kommt vor allem bei elektronenreichen Strukturen wie z.B.: bei Alkenen, aromatischen Ringen oder Carbanionen zur Anwendung, während

die nukleophile Substitution vor allem bei elektronenarmen Strukturen wie z.B.: Alkanen oder aromatischen Strukturen mit elektronenziehenden Substituenten erfolgt. [5]

1.1.2.1 Elektrophile (aromatische) Substitution

Zur elektrophilen Fluorierung von Strukturen wird $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ benötigt, welches entweder mit Hilfe einer $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ - oder einer $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Reaktion im Zyklotron hergestellt wird (siehe Kapitel 1.1.1). Da bei beiden Produktionsmechanismen $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ an der Targetoberfläche absorbiert wird, muss ^{19}F -Gas zugefügt werden, um dies zu verhindern. Das resultierende $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -Gas besitzt daher ein ^{18}F - und ein ^{19}F -Atom, wodurch sich die maximale spezifische Aktivität auf 50% reduziert. Daher ist diese Markierungsmethode auf solche Radiopharmazeutika beschränkt, welche keine hohe spezifische Aktivität benötigen.

Bedingt durch die hohe Reaktivität von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -Gas ist die Selektivität verhältnismäßig gering, wodurch sowohl unerwünschte Reaktionen mit Lösungsmitteln als auch Nebenprodukte entstehen können. Um eine möglichst hohe Reinheit der Radiopharmazeutika garantieren zu können, sind daher mitunter aufwändige Reinigungsschritte notwendig.

$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ kann, zur Verminderung der Reaktivität und Erhöhung der Selektivität, in Acetylhypofluorit ($[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$) oder Xenon-Difluorid ($[^{18}\text{F}]\text{XeF}_2$) umgewandelt werden. [12, 13]

Elektrophile Fluorierungsreaktionen erfordern die Anwesenheit von elektronenspendenden Gruppen (wie z.B.: OH, OCH_3 , NH_2) und Abgangsgruppen (wie z.B.: H, HgR, SnR_3) im Molekül.

Die elektrophile Radiofluorierung wird vor allem zur Herstellung von Analoga von endogenen Substanzen wie z.B.: Aminosäuren verwendet, sofern die Einführung des Fluor-Atoms keine toxischen Wirkungen hervorruft. [1, 5]

1.1.2.2 Nukleophile Substitution

Für die nukleophile Substitution wird non-carrier-added (n.c.a) $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ verwendet, welches über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Reaktion (mit ^{18}O -angereichertem Wasser als Target) im Zyklotron produziert wird. (siehe Kapitel 1.1.1)

$[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ kann in Anwesenheit von Säuren sehr leicht protoniert werden, wodurch Hydrogenfluorid entsteht, welches keine nukleophile Reaktionen eingehen kann. Um dies zu verhindern, muss die Substitution mit polaren, aber aprotischen Lösungsmitteln wie z.B. Acetonitril (AcN), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Dimethylformamid (DMF) erfolgen.

Die nukleophile Substitution folgt dem Mechanismus der S_N2 -Reaktion, wobei bevorzugt Halogene oder Sulfonsäureester wie z.B.: Mesylate, Tosylate und Triflate in einer Struktur durch ^{18}F ersetzt werden. Ein Beispiel dafür wäre die Synthese des am häufigsten angewendeten PET-Tracers $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. (Abb. 1.2)

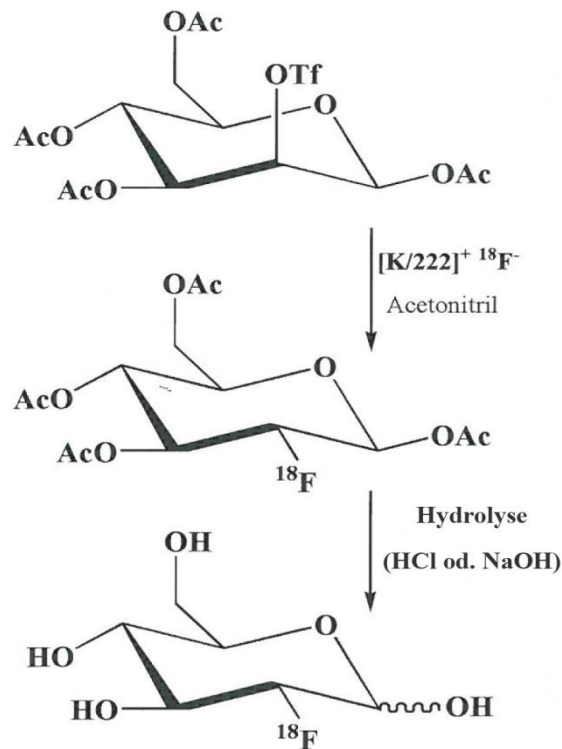


Abb. 1.2: Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-2-deoxy-D-glucose}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) (modifiziert nach [14])

Ausgehend von einem 4-fach acetylierten Mannose-Triflat – Precursor wird dessen Triflat-Gruppe durch ^{18}F substituiert. Durch Hydrolyse erfolgt schließlich die Deacetylierung der Hydroxylgruppen. [15]

Eine große Bedeutung für ^{18}F -markierte Radiopharmazeutika hat jedoch auch die nukleophile Fluorierung von aromatischen Kohlenwasserstoffen, da die Reaktionsprodukte eine große metabolische Stabilität aufweisen. Für die Aktivierung der aromatischen Strukturen sind elektronenziehende Substituenten wie z.B.: Nitro-, Cyano- oder Carbonylgruppen in ortho- oder para-Position zur Abgangsgruppe notwendig. Ein Beispiel hierfür wäre die Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{Altanserin}$, welche durch nukleophile Substitution der para-ständigen Nitrogruppe von Nitroaltanserin erfolgt. (Abb. 2.1) [5]

1.1.3 Spezifische Aktivität von F-18 markierten Radiopharmaka

Unter dem Begriff „spezifische Aktivität“ (siehe auch Kapitel 1.1) versteht man die Aktivität eines radioaktiven Stoffes im Verhältnis zur Aktivität aller Komponenten

(sowohl radioaktiv als auch nicht radioaktiv). Sie wird in GBq/ μ mol ausgedrückt. Die spezifische Aktivität eines $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -Gases wäre beispielsweise die Radioaktivität des Gases (in GBq) dividiert durch die gesamte Menge an ^{18}F und ^{19}F (in μ mol). Bei hoher spezifischer Aktivität ist die erforderliche Stoffmenge eines Tracers im Rahmen einer PET-Untersuchung gering genug (pmol/kg), um pharmakodynamische Effekte zu vermeiden. Wenn die spezifische Aktivität jedoch niedrig ist, ist die Applikation einer hohen Dosis an Radiopharmaka für ein PET-Scanning notwendig, wodurch pharmakologische Nebenwirkungen entstehen könnten. [1]

1.1.4 ^{18}F als Radionuklid für PET-Radiopharmazeutika

Eine Vielzahl verschiedener ^{18}F -Radiotracer wird zur Darstellung unterschiedlicher Bereiche und Mechanismen im Körper eines Menschen angewendet.

Das am häufigsten verwendete ^{18}F -Radionuklid ist 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluordesoxyglucose, kurz $[^{18}\text{F}]$ FDG. Bei der Herstellung dieses Glucose-Analogons wird die Hydroxylgruppe in Position 2 des Zuckers durch ^{18}F substituiert. $[^{18}\text{F}]$ FDG reichert sich nach Applikation in Zellen mit einem hohen Glucose-Stoffwechsel an. Im ersten Schritt der Glykolyse wird die Hydroxylgruppe in Position 6 des Zuckers phosphoryliert, wobei Glucose-6-phosphat entsteht. Anschließend führt das Enzym Glucosephosphat-Isomerase zur Umwandlung von Glucose-6-phosphat in Fructose-6-phosphat. Bei $[^{18}\text{F}]$ FDG kann aufgrund der Substitution der Hydroxylgruppe in Position 2 durch ^{18}F das Enzym den Zucker nicht angreifen. $[^{18}\text{F}]$ FDG kann nicht weiter metabolisiert werden und verbleibt in der Zelle, wo es durch die radioaktive Markierung mittels PET-Scanner sichtbar gemacht werden kann. [16] Diese Eigenschaft wird zur Tumordiagnostik eingesetzt, da Tumorzellen eine erhöhte Glukosestoffwechselrate aufweisen. Einige Körperregionen, wie zum Beispiel Gehirn und Leber, zeigen allerdings einen physiologisch hohen Glukosestoffwechsel, wodurch in diesen die Tumordiagnostik mittels $[^{18}\text{F}]$ FDG erschwert wird.

Der Aminosäuremetabolismus im Körper kann mittels $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltyrosin ($[^{18}\text{F}]$ FET) dargestellt werden. Ähnlich wie $[^{18}\text{F}]$ FDG wird auch das ^{18}F -markierte Aminosäurederivat zur Diagnostik von Tumorerkrankungen, vor allem im Gehirn, eingesetzt. [17]

Neben Glucosemetabolismus und Aminosäuremetabolismus sind unterschiedliche ^{18}F -Radiotracer für verschiedene Mechanismen und Rezeptoren bekannt.

$[^{18}\text{F}]$ -6-Fluoro-DOPA ist ein Radiotracer, der zur Diagnostik neuroendokriner Tumore dient. Dieses Radiopharmakon ist ein Fluor-18-markierter Vorläufer des Dopamins und kann daher zur Darstellung des dopaminergen Systems sowohl im Gehirn als auch im Körper angewendet werden. [18]

[¹⁸F]Altanserin ist ein Antagonist des 5-HT_{2A}-Rezeptors und spielt damit im serotonergen System eine Rolle. Dieser Radiotracer eignet sich zur Diagnostik von psychiatrischen Erkrankungen, befindet sich jedoch derzeit noch im Stadium der klinischen Forschung.

1.2 Anwendung von Mikroreaktoren zur Herstellung von Radiopharmaka

Mikroreaktoren haben seit dem letzten Jahrzehnt im Bereich der organischen Chemie als Alternative zu konventionellen Reaktoren zunehmend an Bedeutung gewonnen und wurden bereits in mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich angewendet. [19, 20, 21, 22, 23, 24, 25]

Auch für die Herstellung von Radiotracern für PET-Studien haben sich Mikroreaktoren bzw. Mikrofluidsysteme als besonders nützlich erwiesen. [26, 27, 28, 29, 30, 31]

Mikroreaktoren setzen sich aus einem Netzwerk von Kapillaren mit einem Durchmesser von 10-300 µm zusammen, die in einem Festkörper eingebettet sind. Verschiedene Materialien, wie z.B.: Silicon, Quarz, Glas und Metall, können für die Herstellung von Mikroreaktoren verwendet werden. Bei der Auswahl des Materials ist zu beachten, dass es mit chemischen Substanzen kompatibel ist, dass es einfach herzustellen ist und dass es einen elektroosmotischen Durchfluss der Lösungsmittel gewährleistet. Glas hat sich als Material für Mikroreaktoren besonders etabliert, da es chemisch inert ist und alle eben genannten Eigenschaften aufweist.

Es gibt eine Reihe von Methoden, die, abhängig vom verwendeten Material, für die Erzeugung von Mikroreaktoren genutzt werden. Dazu zählt die Herstellung mittels Photolithographie, Heißprägung, Spritzguss oder Laser. Die Erzeugung von Mikroreaktoren aus Glas, die sich sehr gut für chemische Synthesen eignen, erfolgt beispielsweise durch Photolithographie. [22]

Die organische bzw. radiochemische Synthese mit Mikroreaktoren bringt, im Vergleich zu konventionellen Methoden, eine Reihe von Vorteilen mit sich. Aus der Bezeichnung „Mikroreaktor“ kann man bereits herauslesen, dass mit sehr kleinen Volumina (im µL-Bereich) gearbeitet wird. Bei konventionellen Synthesen sind die Volumina der Reaktionslösungen im mL-Maßstab der reagierenden Substanzen notwendig; bei Mikrofluidsystemen reicht hingegen bereits ein Volumen von 5 µL pro Reaktand für eine erfolgreiche Synthese aus. Bei gleichbleibender Konzentration in der Reaktionslösung bedeutet das eine Reduktion der eingesetzten Stoffmenge. Besonders bei radiochemischen Synthesen ist dies von Vorteil, da der Precursor oft sehr teuer oder schwer herzustellen ist.

Reaktionen in Mikroreaktoren können innerhalb von Sekunden bzw. Minuten ablaufen, sodass eine rasche Entstehung eines Produkts gewährleistet werden kann.

Mikroreaktoren bieten ein hohes Oberflächen/Volumen – Verhältnis, wodurch der Wärmeaustausch sehr schnell erfolgen kann und eine genaue Temperaturkontrolle möglich ist. Die kurze Verweildauer der Substanzen im Reaktor führt zu einer verbesserten Selektivität und Reinheit sowie zu hohen Produktausbeuten. Bei Synthesen von Radionukliden ist besonders hervorzuheben, dass das Arbeiten mit geringen Mengen an Radioaktivität eine reduzierte radioaktive Belastung des Operators mit sich bringt.

Ein wichtiger Vorteil von Mikrofluidsystemen liegt darin, dass sie unter Druck arbeiten (im Fall des NanoTek® LF bis zu 400 psi), der einerseits durch das Drücken der Lösungsmittel durch den Mikroreaktor und/oder durch weitere Druckregulatoren erreicht wird. Dadurch kann mit Lösungsmitteln über deren Siedepunkt (bei Normaldruck) gearbeitet werden. Der Siedepunkt von DMSO bei Normaldruck liegt beispielsweise bei 189°C [32], jener von AcN bei 81-82°C. [33] Mit Hilfe des NanoTek® LF können Synthesen mit DMSO bzw. mit AcN unter Druck bis zu einer Reaktionstemperatur von 220°C (bei DMSO) bzw. 180°C (bei AcN) ohne Probleme durchgeführt werden. [19, 24, 25, 26]

Mikroreaktoren bzw. Mikrofluidsysteme bieten zahlreiche Vorteile gegenüber klassischen Synthesemethoden, wodurch ihre Anwendung in Bereich der PET – Chemie kontinuierlich an Bedeutung gewinnt.

1.2.1 Advion NanoTek® LF

NanoTek® LF („liquid flow“) von der Firma Advion ist ein Syntheseapparat, der die Synthese von ¹⁸F-markierten Substanzen mit Hilfe von Mikroreaktoren ermöglicht.

Dieses Mikrofluidsystem setzt sich aus einer Einheit mit zwei Pumpen (Pumpe 1 und Pumpe 2), einer Einheit mit einer Pumpe (Pumpe 3) sowie einem Heizblock für vier Reaktoren und einer Concentrator-Einheit zusammen (Abb. 1.3). Die für die Synthese verwendeten Mikroreaktoren sind ringförmig und werden aus Messing hergestellt. Im Inneren des Messingrings befindet sich eine Silicaglas-Kapillare mit einem Durchmesser von 100 µm und einer Länge von 2 m. Der Reaktor ist mit einem thermoresistentem Polymer gefüllt, um die im Ring aufgewickelte Kapillare zu fixieren. (Abb. 1.4)

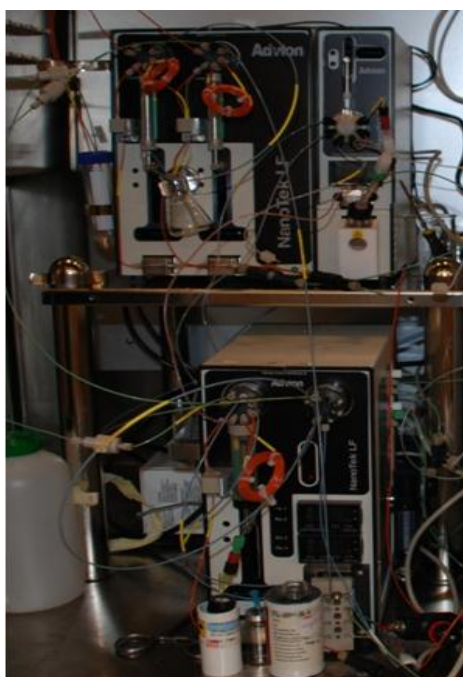


Abb. 1.3: Das Mikrofluidsystem Advion NanoTek® LF

Abb. 1.4: Mikroreaktor des Advion NanoTek® LF



Alle Komponenten des NanoTek® LF werden über eine Software am Laptop gesteuert. Mit Hilfe dieser Software können Reaktionsparameter wie Temperatur, Durchflussgeschwindigkeit sowie Reaktionsvolumina manuell eingestellt werden. Durch Programmierung der genauen Reaktionsbedingungen mit Hilfe eigens erstellten Macros ist auch ein automatisierter Syntheseablauf möglich.

In Abbildung 1.5 ist der Aufbau des NanoTek® LF schematisch dargestellt. In der Concentrator-Einheit („CE“) findet die azeotrope Trocknung statt. Über die Pumpe 1 wird der in DMSO gelöste Precursor in die Vorratsschleife (Storage Loop) gebracht; über die Pumpe 3 wird das getrocknete [^{18}F]Fluorid vom Concentrator-Vial in die Loop aufgezogen. Über die Transferleitungen 1 und 3 werden Precursor bzw. [^{18}F]Fluorid von den Loops zum Reaktor geladen. Nach der Reaktion der beiden Substanzen im Reaktor wird das Produkt in ein Sammelgefäß geleitet. Über die Sweep line von Pumpe 3 zum Reaktor kann dieser mit Lösungsmittel (hier DMSO) gespült und gereinigt werden.

Das System verfügt über drei eingebaute Drucksensoren, die den Druck jeder Pumpe durch eine Kurve darstellen. Durch Verstopfen der Kapillare im Reaktor (evtl. durch Auskristallisieren von Nebenprodukten) ist die Durchlässigkeit der Kapillare nicht mehr gegeben, wodurch es zwangsläufig zu einem Überdruck kommt. Ab einem Druck von

400 psi werden alle laufenden Prozesse automatisch beendet. Dadurch wird das Mikrofluidsystem vor Schäden, die durch den Überdruck auftreten können, geschützt.

Weiters besitzt das NanoTek® LF drei Radioaktivitätsdetektoren, die nach Belieben an drei verschiedene Stellen platziert werden können. Einer davon befand sich direkt an der Loop der Pumpe 3, die die [^{18}F]Fluorid-Lösung speicherte. Mit Hilfe der Detektoren konnten anhand der Radioaktivität die einzelnen Schritte der azeotropen Trocknung sowie der Zerfall von [^{18}F]Fluorid während der Syntheseveruche beobachtet werden.

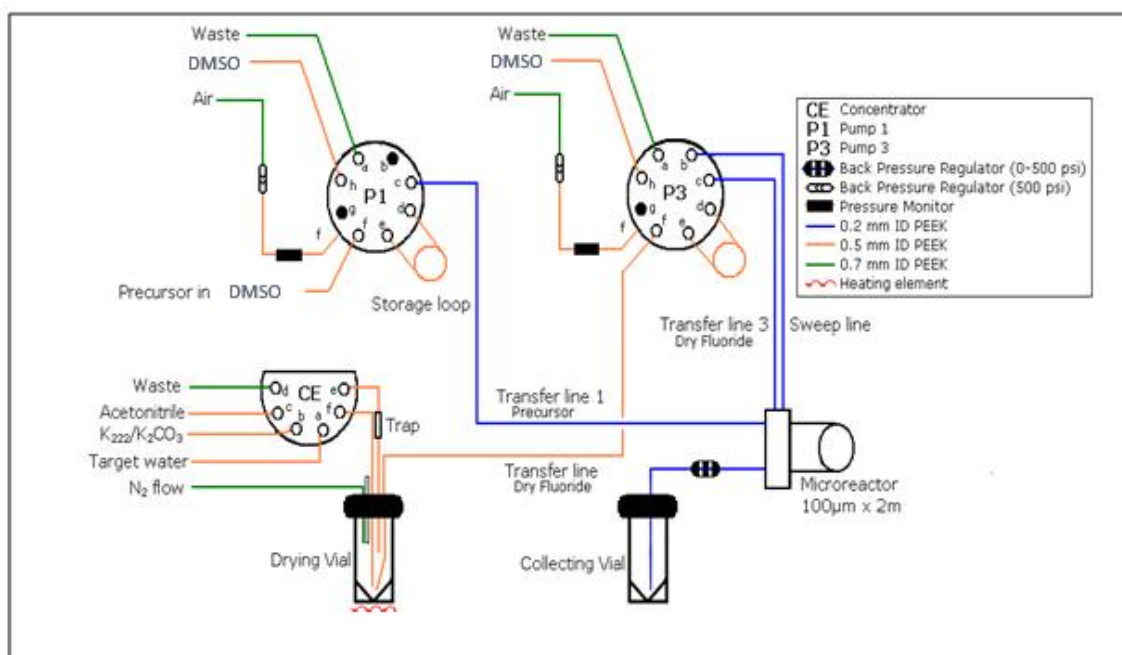


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Set-ups des Mikrofluidsystems NanoTek® LF (modifiziert nach [34])

Neben den genannten Vorteilen, die die Anwendung eines Mikrofluidsystems mit sich bringen, ist besonders zu erwähnen, dass durch die Möglichkeit, mit sehr kleinen Reaktionsvolumina arbeiten zu können, eine große Anzahl an Synthesen an einem Arbeitstag durchgeführt werden können. Beide Loops fassen ein Volumen von je ~400 µL. Bei einem Reaktionsvolumen von 5 µL je Loop und Synthese sind somit theoretisch 80 Synthesen direkt hintereinander möglich.

1.3 Biochemie, Physiologie und Pathophysiologie des serotonergen Systems

1.3.1 Serotonin: Geschichte, Synthese und Vorkommen

Serotonin, auch 5-Hydroxytryptamin (5-HT) oder Enteramin genannt, ist ein Neurotransmitter, der im Zentralnervensystem (ZNS), im Darmnervensystem, im Blut und im Herz-Kreislauf-System vorkommt. Erstmals nachgewiesen wurde Serotonin im Blut. Bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts war bekannt, dass im Blutserum eine Substanz enthalten ist, die konstriktorisch auf die glatte Muskulatur wirkt und damit den Blutdruck erhöht. Diese „tonische“ Substanz aus dem „Serum“ (Sero-tonin) wurde ca. 100 Jahre später als das Indolamin 5-Hydroxytryptamin identifiziert. Enteramin, 1933 erstmals aus enterochromaffinen Zellen isoliert, wurde 1952 als 5-HT erkannt. 1953 wurde Serotonin schließlich auch im ZNS nachgewiesen und dessen Funktion als Neurotransmitter belegt. [35, 36, 37]

Ausgangssubstanz der Synthese von 5-Hydroxytryptamin ist die essentielle Aminosäure Tryptophan, die durch Hydroxylierung zu 5-Hydroxytryptophan und anschließender Decarboxylierung zu Serotonin umgewandelt wird. In der Epiphyse ist Serotonin die biosynthetische Vorstufe von Melatonin (O-Methyl-N-acetylserotonin). Gemeinsam steuern diese beiden Amine den circadianen Rhythmus des Säugetierorganismus. Abgebaut wird Serotonin mithilfe des Enzyms Monoaminoxidase (MAO) zu 5-Hydroxyindolylacetaldehyd, das wiederum durch die Aldehyd-Dehydrogenase zu 5-Hydroxyindolylessigsäure metabolisiert wird. (Abb. 1.6)

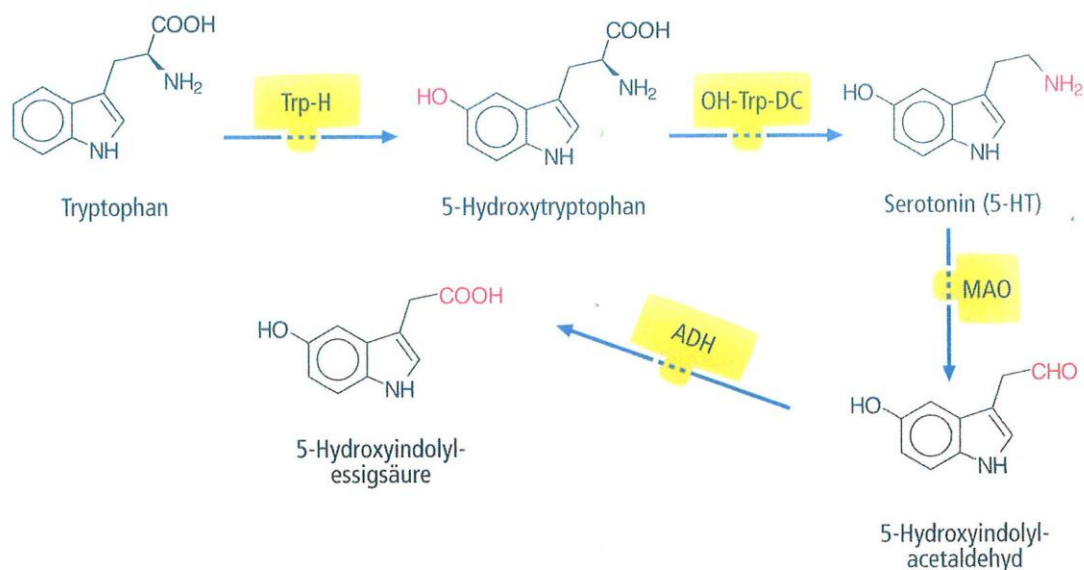


Abb. 1.6: Biosynthese und Biotransformation von Serotonin (modifiziert nach [38])

Serotonin liegt im Organismus von Säugetieren sowohl neuronal als auch extraneuronal vor. Neuronal gespeichertes Serotonin wirkt als Neurotransmitter und ist in weiten Teilen des Gehirns (vor allem in den Raphe-Kernen) sowie im gesamten Gastrointestinaltrakt zu finden. Extraneuronal wird Serotonin in den enterochromaffinen Zellen des Dünndarms synthetisiert, gespeichert und nach Abgabe ins Blut von den Thrombozyten aufgenommen. Bei der primären Hämostase verursacht aus den Thrombozyten freigesetztes Serotonin eine lokale Vasokonstriktion. [38, 39]

1.3.2 Physiologische Serotoninwirkungen

Serotonin ist für eine Vielzahl unterschiedlicher physiologischer Wirkungen im menschlichen Körper verantwortlich.

Im Herz-Kreislauf-System wirkt Serotonin sowohl kontrahierend als auch relaxierend auf die glatte Muskulatur von Blutgefäßen. In der Lunge und in den Nieren steht die blutgefäßverengende Wirkung im Vordergrund, während in der Skelettmuskulatur die blutgefäßerweiternde Wirkung dominiert. [40] Im Bereich der Blutgerinnung führt Serotonin nach der Freisetzung aus den Thrombozyten zu deren Aggregation. Durch Vasokonstriktion in kleinen Blutgefäßen und damit verbundener Reduktion des Blutstroms hat es einen positiven Effekt auf die Wundheilung. [41] Enterochromaffine Zellen im Magen-Darm-Trakt setzen bei Druckanstieg im Darmlumen Serotonin frei, womit die Kontraktion und Relaxation der Darmmuskulatur, kurz Peristaltik genannt, angeregt wird. [42]

Im ZNS, wo Serotonin vor allem in den Raphe-Kernen gespeichert wird, steuert der Neurotransmitter viele wichtige Funktionen, unter anderem die Regulation der Körpertemperatur, die Sensorik, die Schmerzempfindung und –verarbeitung, den Appetit, das Sexualverhalten, die Hormonsekretion und den Wach-Schlaf-Rhythmus. [43]

10% der gesamten Menge an Serotonin im Körper befindet sich im Gehirn, währenddessen 90% in der Peripherie zirkulieren. [44]

Ursache für die Vielfalt der physiologischen Effekte ist die große Zahl unterschiedlicher Serotoninrezeptoren, die detailliert in Kapitel 1.3.4 beschrieben werden.

1.3.3 Pathophysiologische Serotoninwirkungen

Neben seinen zahlreichen physiologischen Wirkungen spielt Serotonin auch pathophysiologisch eine wichtige Rolle. Allen voran ist hier das Krankheitsbild der Migräne zu erwähnen, an deren Auslösung vor allem 5-HT_{2B}-Rezeptoren beteiligt sind. Nach Freisetzung von Serotonin aus Thrombozyten oder Nervenendigungen bindet es an 5-HT_{2B}-Rezeptoren an meningealen Gefäßen und führt dort zu einer Erhöhung der

Stickstoffmonoxid-Konzentration, wodurch Gefäße im Gehirn dilatiert werden und ein pulsierender Schmerz entsteht. Zusätzlich kommt es über afferente Fasern des Nervus trigeminus zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Substanz P. 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren sind in diesem Zusammenhang wichtige Angriffspunkte für Arzneistoffe, die den Entzündungsprozess während eines Migräneanfalls unterbinden. [45]

Serotonin ist auch an psychischen Erkrankungen wie Depressionen, Angst- und Zwangsstörungen beteiligt. Die genauen Ursachen dieser Psychosen sind nicht vollständig geklärt. Als gesichert gilt, dass Störungen im Gleichgewicht der Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin und Dopamin und folglich Veränderungen in der Rezeptorverteilung bzw. -dichte zugrunde liegen. [38] Speziell im Bezug auf Serotonin liegt bei den genannten Erkrankungen ein Mangel im Gehirn vor, der mit Selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmern (SSRI) behandelt wird. Diese hemmen die Wiederaufnahme von Serotonin in der Präsynapse und erhöhen somit dessen Konzentration im synaptischen Spalt. [46]

Eine weitere pathophysiologische Erscheinung ist das Karzinoid. Dabei handelt es sich um eine vorwiegend im Gastrointestinaltrakt auftretende, seltene (semi-)maligne Entartung enterochromaffiner Zellen, die zu einer vermehrten Serotoninfreisetzung führt. [38]

1.3.4 Serotoninrezeptoren: Vorkommen, Effekte bei Stimulierung und therapeutisch eingesetzte Agonisten/Antagonisten

Für keinen anderen Neurotransmitter können bislang derart viele unterschiedliche Rezeptoren nachgewiesen werden wie für Serotonin. Heute kennt man mindestens 19 Typen bzw. Subtypen von Serotoninrezeptoren, die sich in 7 Familien (5-HT₁ bis 5-HT₇-Rezeptoren) und zusätzliche Untergruppen einteilen lassen.

Während bei den Typen 1-4 die funktionelle Bedeutung größtenteils geklärt ist, konnten die Rezeptoren der Gruppen 5-7 zwar im ZNS nachgewiesen werden, ihre physiologische und therapeutische Bedeutung ist aber bis heute weitgehend ungeklärt. Mit Ausnahme der 5-HT₃-Rezeptoren, bei denen es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle handelt, gehören alle Serotonin-Rezeptoren zur großen Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Die Abbildung 1.7 bietet einen Überblick über das Vorkommen der Serotoninrezeptor-Subtypen, deren Agonisten, Antagonisten und Second-Messenger-Wirkungen. [37, 38]

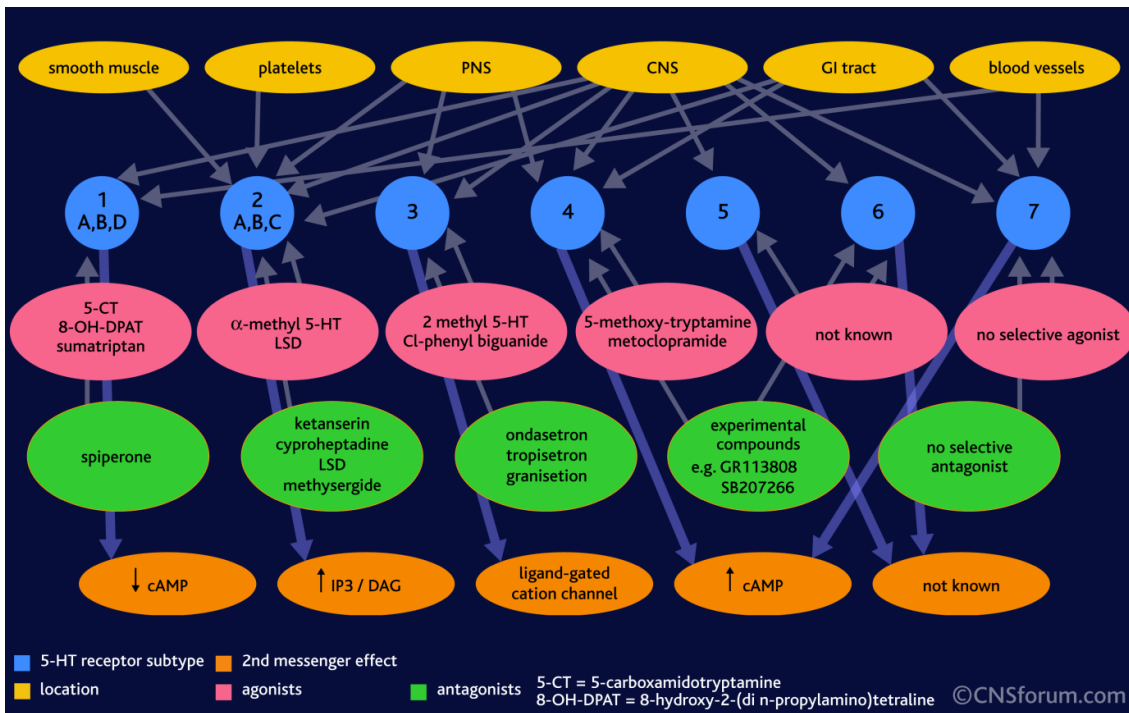


Abb. 1.7: Klassifizierung des serotonergen Systems [47]

1.3.4.1 5-HT₁-Rezeptoren

Zur Gruppe der 5-HT₁-Rezeptoren werden mindestens 5 Subtypen gezählt (A, B, D, E, F), wodurch sie die größte Gruppe der 5-HT-Rezeptoren darstellen. [48] Diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besitzen ein inhibierendes G-Protein (G_i-Protein), wodurch bei Stimulierung die Adenylatcyclase, die für die Cyclisierung von ATP zu cAMP zuständig ist, gehemmt wird und infolge dessen die intrazelluläre cAMP-Konzentration sinkt. cAMP ist ein sekundärer Botenstoff und Regulator vieler intrazellulärer Enzyme. [49]

Präsynaptische und postsynaptische 5-HT_{1A}-Rezeptoren sind im ZNS für die Regulation von Schlaf und Nahrungsaufnahme, für die Blutdrucksenkung, für die Regulation der Körpertemperatur sowie für Angstreaktionen verantwortlich. Demzufolge werden Agonisten dieses Rezeptorsubtyps als Anxiolytica und zur Blutdrucksenkung eingesetzt. [38, 48]

5-HT_{1B}-Rezeptoren sind ebenfalls im ZNS lokalisiert und führen zu einer Hemmung der GABA- und Glutamat-Freisetzung. Durch ihre Stimulierung werden große Gefäße dilatiert, Meningealgefäße und Koronarien jedoch kontrahiert. 5-HT_{1B}-Rezeptor-Agonisten sind demnach Migränetherapeutika, die die erweiterten Gefäße im Gehirn verengen,

jedoch führen sie auch zu einer Konstriktion der Koronararterien, wodurch es zu unerwünschten kardiovaskulären Beschwerden kommen kann. [37, 38]

5-HT_{1D}-Rezeptoren sind dem 5-HT_{1B}-Subtyp sehr ähnlich. Sie sind ebenfalls in den Meningealgefäßen zu finden, wo ihre Erregung zur einer Vasokonstriktion führt. Zusätzlich hemmt die Erregung dieser Rezeptoren die Freisetzung entzündungsfördernder Peptide. Agonisten dieses Subtyps sind ebenfalls bei Migräne gut wirksam. Im Unterschied zu 5-HT_{1B}-Rezeptor-Agonisten haben sie aber keinen negativen Einfluss auf die Koronarien. [37]

5-HT_{1F}-Rezeptoren spielen, ebenso wie die 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren, bei der Unterdrückung der neuronalen Entzündung eine Rolle und stellen daher ein neuartiges Ziel zur Entwicklung von Migränetherapeutika dar. [50]

1.3.4.2 5-HT₂-Rezeptoren

5-HT₂-Rezeptoren umfassen zumindest 3 Subtypen (A, B, C), die allesamt wichtige physiologische Bedeutungen besitzen. Sie gehören ebenfalls zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, besitzen aber im Unterschied zu 5-HT₁-Rezeptoren ein G_q-Protein. Bei Stimulierung des Rezeptors kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C und damit über die Bildung von Inositoltriphosphat und Diacylglycerol zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern. [38, 48]

5-HT_{2A}-Rezeptoren findet man im ZNS, wo deren Erregung psychotrope Wirkungen wie Halluzinationen auslösen. Die halluzinogene Wirkung von LSD ist auf die Stimulierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren zurückzuführen. Weiters sind Rezeptoren dieses Subtyps in der glatten Muskulatur der Blutgefäße lokalisiert, über die Serotonin vasopressorische Wirkungen hervorruft, sowie auf den Thrombozyten, wo ihre Stimulation die Aggregation der Blutplättchen bewirkt. Eine verminderte 5-HT_{2A}-Rezeptordichte im Gehirn findet man bei Personen, die an depressiven Störungen erkrankt sind. Neuroleptika werden als Antagonisten des 5-HT_{2A}-Rezeptors zur Behandlung psychischer Erkrankungen eingesetzt. [37, 44]

5-HT_{2B}-Rezeptoren sind überwiegend in den Blutgefäßen zu finden. Bei Erregung kommt es infolge einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel von Blutgefäßen zu einer Vasodilatation. [37]

5-HT_{2C}-Rezeptoren sind ausschließlich im ZNS lokalisiert und sind an der Regulation von Nahrungsaufnahme, Schlaf-, Angst- und Stressverhalten beteiligt. [38]

1.3.4.3 5-HT₃-Rezeptoren

Bei 5-HT₃-Rezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle, die keine Subtypen beinhalten. Diese Kanäle bestehen aus fünf Proteinmolekülen und sind selektiv für Natrium- und Kaliumionen. Durch Erregung neuronaler 5-HT₃-Rezeptoren kommt es zu einer Ausschüttung von Neurotransmittern wie z.B.: Noradrenalin und Substanz P. Diese Rezeptorklasse ist daher an der Auslösung einer Reihe von reflektorischen Vorgängen beteiligt. 5-HT₃-Rezeptoren sind in der Area postrema der Medulla oblongata (Breachzentrum) und an afferenten Vagusfasern und damit in Nachbarschaft der enterochromaffinen Zellen des Darms lokalisiert. Durch Erregung dieser Rezeptoren ruft Serotonin, wenn es im Rahmen einer Chemotherapie mit Cytostatika oder infolge einer Bestrahlung durch Zerstörung von enterochromaffinen Zellen in großen Mengen freigesetzt wird, starke Übelkeit und Erbrechen hervor. Freie Nervenendigungen von Schmerzfasern tragen ebenfalls 5-HT₃-Rezeptoren, deren Stimulation durch Serotonin Schmerzen auslösen. 5-HT₃-Antagonisten werden zur Behandlung von Erbrechen, ausgelöst durch Cytostatika oder Strahlentherapie, eingesetzt. [38, 48]

1.3.4.4 5-HT₄-Rezeptoren

Diese Rezeptorklasse ist wiederum G-Protein-gekoppelt, besitzt aber im Unterschied zu 5-HT₁- und 5-HT₂-Rezeptoren ein stimulierendes G-Protein (G_S-Protein), das die Adenylatcyclase aktiviert und damit die cAMP-Konzentration erhöht. 5-HT₄-Rezeptoren sind im ZNS und im Gastrointestinaltrakt lokalisiert. Sie sind über die Freisetzung von Acetylcholin an der Steigerung der Peristaltik im Gastrointestinaltrakt beteiligt und erhöhen damit die Darmmotilität. Dementsprechend werden Agonisten dieser Rezeptorklasse therapeutisch bei Motilitätsstörungen des Gastrointestinaltrakts eingesetzt. [38]

1.3.4.5 5-HT₅-, 5-HT₆-, 5-HT₇-Rezeptoren

Die Rezeptoren der Subtypen 5-7 gehören zur Gruppe der neueren 5-HT-Rezeptoren, die sich molekularbiologisch deutlich von den anderen Serotoninrezeptoren unterscheiden. Ihre Aminosäuresequenz ist zwar bereits geklärt, über ihre funktionelle Bedeutung ist aber bisher noch wenig bekannt, was nomenklatorisch durch Verwendung kleiner Buchstaben ausgedrückt wird. [48]

Über 5-HT₅-Rezeptoren weiß man bereits, dass sie in zwei Subtypen eingeteilt werden können (A und B) und dass beide im ZNS lokalisiert sind. 5-HT_{5A}-Rezeptoren wurden in Mäusen, Ratten und auch beim Menschen identifiziert, währenddessen 5-HT_{5B}-

Rezeptoren ebenfalls in Mäusen und Ratten, aber nicht im Menschen exprimiert werden, da hier die codierende Sequenz durch Stop-Codons unterbrochen ist und daher die Proteinbiosynthese nicht stattfinden kann. [51]

Der ebenfalls im ZNS vorkommende, G_s-Protein-gekoppelte 5-HT₆-Rezeptor kann möglicherweise mit Lernvorgängen in Verbindung gebracht werden.

Der von den „neueren“ 5-HT-Rezeptoren bisher am besten untersuchte, ubiquitär vorkommende 5-HT₇-Rezeptor ist an der Regulation des Tag-Nacht-Rhythmus, der Körpertemperatur sowie an der Blutdrucksenkung beteiligt. [52]

1.3.5 Anwendung von PET-Tracern für die Diagnostik des serotonergen Systems

Die PET-Radionuklide ¹¹C (Halbwertszeit: 20.4 min) [53] und ¹⁸F (Halbwertszeit: 109.7 min) [5] eignen sich für die Erforschung des serotonergen Systems mittels PET. Für diverse Studien zur Untersuchung der unterschiedlichen Rezeptorverteilungen und -funktionen sowie des Serotonintransporters wurden bisher verschiedene Radiopharmaka erfolgreich eingesetzt, unter anderem [¹¹C]WAY-100635, [¹¹C]DASB und [¹⁸F]Altanserin.

Bei [¹¹C]WAY-100635 handelt es sich um einen Antagonisten des 5-HT_{1A}-Rezeptors, mit dessen Hilfe die Dichte dieser Rezeptoren mit Angstzuständen, Phobien und Panikattacken in Korrelation gebracht werden kann. [54, 55]

[¹¹C]DASB ist ein Radioligand, der selektiv an den Serotonin-Transportmolekülen (SERT) im Gehirn bindet. Serotonin-Transporter sind Angriffspunkte bei der Behandlung von Depressionen mittels SSRI, wodurch dieser PET-Tracer unter anderem zur Darstellung der SERT mittels PET bei depressiven Patienten angewendet wird. [56, 57]

[¹⁸F]Altanserin ist als 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonist bei der Diagnostik verschiedener Psychosen von Bedeutung. Dessen Eigenschaften und Funktionen werden in den Kapiteln 1.3.6 und 2.1 detailliert erläutert.

1.3.6 [¹⁸F]Altanserin: ein spezifischer Ligand des 5-HT_{2A}-Rezeptors

Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, ist Serotonin an vielen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen im menschlichen Körper beteiligt. Als

Neurotransmitter im ZNS steuert es die Körpertemperatur, den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Schmerzempfindung, das Sexualverhalten und den Appetit. Weiters übt Serotonin einen Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System und die Blutgerinnung aus. Pathophysiologisch ist der Neurotransmitter in viele psychische Erkrankungen wie Depressionen, Angst- und Zwangsstörungen [38], Schizophrenie [58] und Magersucht [59, 60] involviert. Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer [61] ist Serotonin beteiligt. Vor allem der 5-HT_{2A}-Rezeptor spielt, in Hinblick auf dessen Dichte und Syntheserate im ZNS, in Zusammenhang mit den eben erwähnten Krankheiten eine bedeutsame Rolle, weshalb er in der nuklearmedizinischen Forschung besondere Bedeutung erlangt hat. Um verschiedene Aspekte des serotonergen Systems untersuchen zu können, wurden bereits in vielen Studien unterschiedliche Radiotracer beschrieben, deren Bindung an 5-HT_{2A}-Rezeptoren in den verschiedenen Hirnregionen mittels PET sichtbar gemacht werden kann. Potentielle Radioliganden, die für die Darstellung der 5-HT_{2A}-Rezeptorverteilung im Gehirn mittels PET in klinischen Studien entwickelt und untersucht wurden, sind: [¹¹C]Ketanserin [62], [¹⁸F]Spiperon [63], [¹¹C]Methylspiperon [64] und [¹⁸F]Setoperon [65]. Als Nachteil all dieser Tracer hat sich herausgestellt, dass sie nicht spezifisch an den 5-HT_{2A}-Rezeptor binden, sondern auch an andere Rezeptoren, wie z.B. Dopamin- und 5-HT₁-Rezeptoren. Daher war man sehr daran interessiert, selektivere 5-HT_{2A}-Rezeptorliganden für PET-Studien zu finden. [¹⁸F]Altanserin, ein 4-Fluorbenzyl-Piperidin-Derivat, strukturell Ketanserin und Setoperon sehr ähnlich, hat sich als wichtiger PET-Tracer in vivo für die Darstellung des 5-HT_{2A}-Rezeptors herausgestellt. [66] (Abb. 1.8)

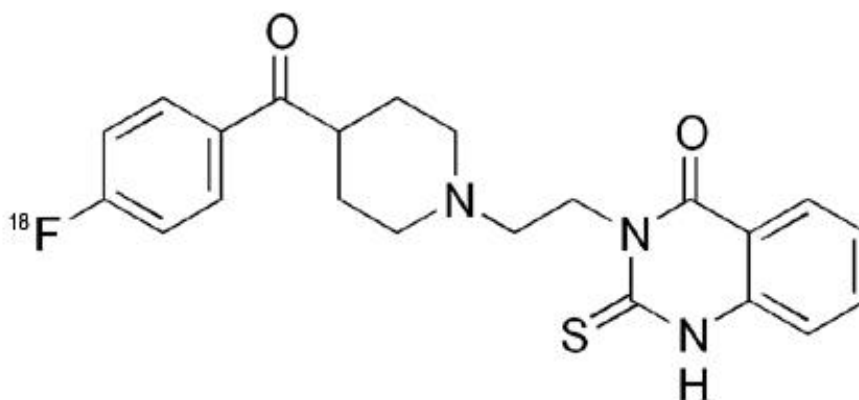


Abb. 1.8: 3-[2-[4-(4-[¹⁸F]Fluorobenzoyl)-1-piperidyl]ethyl]-2-sulfany-3H-quinazolin-4-on ([¹⁸F]Altanserin)

Verglichen mit den anderen genannten Radiotracer bindet [¹⁸F]Altanserin als selektiver 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonist mit hoher Affinität an den 5-HT_{2A}-Rezeptor

($K_i = 0.3 \text{ nmol/l}$) und mit weitaus geringerer Affinität an andere Serotonin-Rezeptor-Subtypen (5-HT_{2C}: $K_i = 6.0 \text{ nmol/l}$; 5-HT₆: $K_i = 1.756 \text{ nmol/l}$; 5-HT₇: $K_i = 15 \text{ nmol/l}$) [67] und anderen Rezeptoren (α_1 -Rez.: $K_i = 4.55 \text{ nmol/l}$, D₂-Rez.: $K_i = 62 \text{ nmol/l}$, H₁-Rez.: 39 nmol/l) [68]. Aufgrund der hohen Selektivität wurde [¹⁸F]Altanserin bereits in vielen klinischen Studien als PET-Tracer zur Quantifizierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors im menschlichen Gehirn verwendet. [66, 69, 70] In einer Studie von Biver et al. (1994) [71] wurde die Bindung von [¹⁸F]Altanserin in den einzelnen Hirnregionen an zwölf gesunden Probanden im Alter zwischen 27 und 45 Jahren mittels PET untersucht. Die Aufzeichnungen zeigten eine hohe Akkumulation von Radioaktivität in den kortikalen Regionen und geringe Akkumulierung in den Basalganglien und im Kleinhirn. Desweiteren wurde in mehreren Studien [59, 60, 72, 73, 74, 75, 76] die Bindung von [¹⁸F]Altanserin am 5-HT_{2A}-Rezeptor in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter sowie psychiatrischen Erkrankungen wie Magersucht, Schizophrenie und Zwangsstörungen untersucht.

Biver et al. (1996) [72] arbeitete die geschlechtsspezifischen Bindungsunterschiede von [¹⁸F]Altanserin am 5-HT_{2A}-Rezeptor mittels PET heraus. Zu diesem Zweck wurden 22 gesunde Probanden (11 Männer zwischen 23 und 64 Jahren und 11 Frauen zwischen 24 und 62 Jahren) zur Untersuchung herangezogen. Das Ergebnis zeigte bei Männern eine höhere Bindungskapazität als bei Frauen, speziell in den frontalen und cingulären Kortices.

Die Arbeit von Meltzer et al. (1998) [73] beschäftigte sich mit der Bindung von [¹⁸F]Altanserin am 5-HT_{2A}-Rezeptor in Abhängigkeit vom Alter. Die dafür vorgesehene Probandengruppe bestand aus 9 gesunden älteren Personen (im Alter von 61 bis 76 Jahren) und 9 gesunden jungen Personen (im Alter von 18 bis 29 Jahren). Bei den älteren Probanden konnte in allen Hirnregionen eine signifikante Reduktion der Bindungskapazität von [¹⁸F]Altanserin beobachtet werden.

Sheline et al. (2002) [74] belegte in ihrer Arbeit dieses Ergebnis und beschrieb zusätzlich, dass der Verlust von 5-HT_{2A}-Rezeptoren zwischen 20 und 50 Jahren mit bis zu 70% Abnahme fortschreitend verläuft und dann abflacht.

Bei psychiatrischen Erkrankungen wie Magersucht [59, 60] und Schizophrenie [75] fand man ebenfalls eine erhebliche Reduktion der Bindungskapazität von [¹⁸F]Altanserin am 5-HT_{2A}-Rezeptor. Einzig bei Zwangsstörungen wiesen Patienten, verglichen mit gesunden Personen, eine erhöhte Rezeptorbindung im Nucleus

caudatus auf. In der Arbeitsgruppe von Adams et al. (2004) [76] wurden auf Basis von vorherigen Studien Ergebnisse bezüglich geschlechts- und altersspezifischen [^{18}F]Altanserin-Bindungsunterschieden am Serotoninrezeptor vom Subtyp 2A verifiziert bzw. falsifiziert. Sie kamen zu dem Erkenntnis, dass das Geschlecht die [^{18}F]Altanserin-Bindung nicht beeinflusst und widerlegen damit das Ergebnis von Biver et al. (1996). Bindungsunterschiede in Abhängigkeit vom Alter wurden verifiziert und müssen daher bei der Erarbeitung von klinischen Studien berücksichtigt werden.

All die bisherigen Erkenntnisse über [^{18}F]Altanserin bestätigen, dass dieser radioaktiv markierte Ligand ein geeigneter PET-Tracer sowohl für die Erforschung der 5-HT_{2A}-Rezeptorverteilung in den einzelnen Hirnregionen als auch für die Diagnose von psychischen Erkrankungen ist.

Bis dato stellte jedoch eine rasche und zuverlässige Radiosynthese von [^{18}F]Altanserin eine Herausforderung dar, weshalb man bestrebt war, eine sichere und schnelle Synthesemethode zu finden. Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wird eine Methode vorgestellt, mit Hilfe dieser [^{18}F]Altanserin innerhalb kurzer Zeit zuverlässig synthetisiert werden kann.

2 Experimenteller Teil

2.1 Radiosynthese von [^{18}F]Altanserin

Altanserin ist ein Fluorobenzoyl-piperidin-Derivat, das strukturelle Ähnlichkeit zum Ketanserin hat und wie dieses ein Antagonist des 5-HT_{2A}-Rezeptors ist. Im Unterschied zu Ketanserin trägt Altanserin einen Sulfanyl-Substituenten in Position 2 des Chinazolin-Rings und weist eine deutlich höhere Affinität zum 5-HT_{2A}-Rezeptor auf (Altanserin: $K_i = 0.3 \text{ nmol/l}$; [67] Ketanserin $K_i = 1 \text{ nmol/l}$ [77]). In seiner ^{18}F -markierten Form wird Altanserin erfolgreich in PET-Studien für die Darstellung dieses Rezeptors verwendet. Die Synthese von [^{18}F]Altanserin (3-[2-[4-(4-[^{18}F]Fluorobenzoyl)-1-piperidyl]ethyl]-2-sulfanyl-3H-quinazolin-4-on) wird mit Hilfe des Precursors 3-[2-[4-(4-Nitrobenzoyl)-1-piperidyl]ethyl]-2-sulfanyl-3H-quinazolin-4-on (Nitroaltanserin) durchgeführt. Dabei wird die Nitrogruppe in Position 4 des Benzoylrings durch [^{18}F]Fluorid nukleophil substituiert. Die Synthese erfolgt in Anwesenheit des Kryptofix 2.2.2/ K^+ -Komplexes in einem Reaktionsschritt. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 2.1 dargestellt. [78, 79]

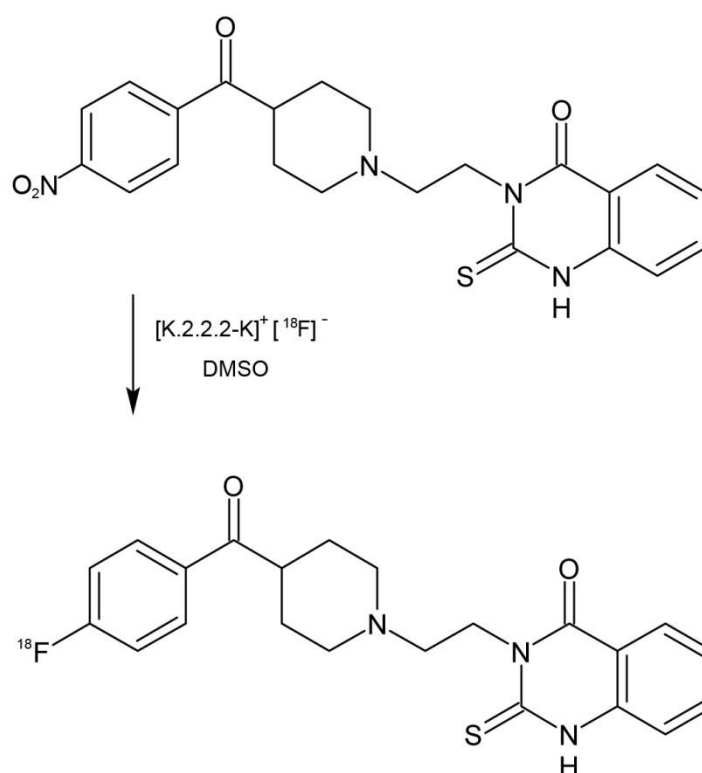


Abb. 2.1: Reaktion Nitroaltanserin \rightarrow $[^{18}\text{F}]$ Altanserin (modifiziert nach [78])

Mehrere Arbeitsgruppen haben sich bereits mit teils unterschiedlichen Synthesemethoden von $[^{18}\text{F}]$ Altanserin beschäftigt. In einer Studie von Lemaire et al. (1991) [78] erfolgte die nukleophile Substitution der Nitro-Gruppe des Precursors Nitroaltanserin durch Erhitzen einer Lösung von trägerarmen $(\text{Kryptofix 2.2.2}/\text{K}_2\text{CO}_3)^+ [^{18}\text{F}]^-$, Nitroaltanserin und DMSO in einer Mikrowelle. Nach der Aufreinigung des Produkts mittels präparativer HPLC erhielt man eine radiochemische Ausbeute von 10%, eine spezifische Aktivität von 29.6 - 48.1 GBq/ μmol sowie eine radiochemische Reinheit von >99% am Ende der Synthese, die inklusive Aufreinigung 110 Minuten gedauert hat.

Bei der Arbeitsgruppe von Monclus et al. (1998) [80] wurde die Synthese ebenfalls durch Erhitzen in einer Labor-Mikrowelle durchgeführt, gefolgt von einer Vorreinigung des Produkt mittels C-18 SepPak, einer Isolierung mittels semi-präparativer HPLC sowie einer Formulierung der injizierbaren Lösung. Alle erwähnten Schritte wurden in einem automatisierten Syntheseapparat durchgeführt, der einige Vorteile aufweist (geringe Kosten, geringer Platzbedarf und vor allem kein notwendiger Kontakt zwischen Operator und Radioaktivität). Die Synthesedauer (inklusive Qualitätskontrolle

durch analytische RP-HPLC) betrug 90 Minuten, die spezifische Aktivität > 37 GBq/μmol und die radiochemische Ausbeute $20 \pm 6\%$ am Ende der Synthese.

Ähnlich wie Monclus et al. verwendete Tan et al. (1999) [79] „ferngesteuerte“ Synthesemodule, die eine Synthese in der Mikrowelle, eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC sowie eine sterile Filtration ermöglichen. Bei dieser Methode wurde eine Synthesedauer von 114 ± 9 Minuten, eine spezifische Aktivität von 136.9 ± 81.4 GBq/μmol und eine radiochemische Ausbeute von 23% verzeichnet.

Hamacher et al. (2006) [81] wählten einen anderen Ansatz. Sie produzierten [^{18}F]Altanserin in einer elektrochemischen Zelle. Diese Zelle erlaubte eine rasche Abscheidung von [^{18}F] an der Anode. Die Synthese erfolgte mit einer Lösung von Kryptat ($[\text{K222}/\text{K}_2\text{CO}_3]^+\text{HCO}_3^-$), Nitroaltanserin und DMSO in einer 140°C heißen Zelle unter Anlegung eines elektrischen Feldes. Im Anschluss wurden eine HPLC-Aufreinigung, eine Festphasenextraktion und eine Formulierung des Produkts durchgeführt. Nach einer Synthesedauer von 75 Minuten betrug die spezifische Aktivität 499.5 GBq/μmol und die radiochemische Ausbeute $23 \pm 5\%$.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die Synthese mit Hilfe eines Mikrofluidsystems (Advion NanoTek[®] LF) durchgeführt. [82] Durch Verwendung von Mikroreaktoren reichten bereits geringe Mengen von [^{18}F]Fluorid und Precursor für eine Synthese von [^{18}F]Altanserin mit einer radiochemischen Inkorporation von bis zu 60% aus. Ein weiterer, wichtiger Vorteil dieser Methode ist die reduzierte radioaktive Belastung des Operators, da nur geringe Mengen an Radioaktivität für eine erfolgreiche Synthese notwendig sind. Inklusive Aufreinigung mittels präparativer HPLC und Formulierung des Produkts betrug die Synthesedauer ca. 90 Minuten.

2.1.1 Materialien

Im folgenden Abschnitt sind die für die Synthese und Qualitätskontrolle notwendigen Chemikalien, Lösungen, Gase und Gerätschaften aufgelistet.

2.1.1.1 Materialien für die Synthese

2.1.1.1.1 Chemikalien, Lösungen und Gase

- Nitroaltanserin (Precursor): ABX (Advanced biochemical compounds), Deutschland. CAS: 139418-53-4
- Dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland CAS: 67-68-5
- Acetonitril (AcN): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland CAS: 75-05-8
- Kryptofix: Kryptofix[®] 222, Merck KGaA, Deutschland
- K₂CO₃: Kaliumcarbonat, Merck KGaA, Deutschland CAS: 584-08-7
- Aqua purificata: Anstaltsapotheke, AKH Wien, Österreich
- [¹⁸F]Fluorid: PET-Zentrum, AKH Wien, Österreich
- Stickstoff: technisch verdichtet, Messer Gas, Österreich
- Dimethylformamid (DMF): Fluka Chemika, Schweiz. CAS: 68-12-2

2.1.1.1.2 Gerätschaften

- GE PETtrace Zyklotron: 16.5 MeV Protonen; GE Medical Systems, Uppsala, Schweden
- Advion NanoTek[®] LF: Advion, Software 1.4.0; Ithaca, NY, USA
- Anionentauscher: Chromafix Solid Phase Extraction PS-HCO₃⁻, Macherey-Nagel, Deutschland
- Mikroreaktoren: 100 µm x 2 m, Advion, Ithaca, NY, USA
- Produktsammelgefäß: Eppendorf Safe-Lock Tube (1.5 mL) bzw. Wheaton V-Vial 5 mL (inkl. TFE/Silikon-Septum)
- Heizblock: IKA Labortechnik, ETS-D4 fuzzy, Deutschland
- Rückschlagventil: Advion; Ithaca, NY, USA

2.1.1.2 Materialien für die Qualitätskontrolle

2.1.1.2.1 Chemikalien, Lösungen und Gase

- Altanserin (Standard): ABX (Advanced biochemical compounds), Deutschland. CAS: 76330-71-7
- Ammoniumacetat: Merck KGaA, Deutschland. CAS: 631-61-8
- Aqua purificata: Anstaltsapotheke, AKH Wien, Österreich
- Salzsäure (HCl, 1N): Merck KGaA, Deutschland. CAS: 7647-01-0
- Acetonitril (AcN): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
CAS: 75-05-8
- Gas d. Autoradiographen: Tecline 1% Isobutan, 2.5% CO₂ in Argon, Messer Gas, Österreich

2.1.1.2.2 Gerätschaften

- Analyt. HPLC-Pumpe: LaChrom Pump L-7100, Merck-Hitachi
Software: GINA Star Station
Radiodetektor: NaI-Kristall, Iteco, Italien
UV-Detektor: Wellenlänge 254 nm
- Analyt. HPLC-Säule: Phenomenex Gemini 3 μ C-18 110A,
150 x 4.60 mm, 3 micron
- Dosiskalibrator: Veenstra Instruments VDC-404
- DC-Platten: TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck KGaA, Deutschland
- Autoradiograph: Instantimager, Packard Instrument Company, USA

2.1.2 Methoden

2.1.2.1 Vorbereitung des Advion NanoTek[®] LF für die Radiosynthese

Bevor die Synthese von [¹⁸F]Altanserin starten konnte, waren einige wichtige Schritte zur Vorbereitung des Mikrofluidsystems notwendig. Um potentielle Kontaminationen zu vermeiden, wurden am Beginn und am Ende eines Synthesetages alle Komponenten des NanoTek[®] LF (Spritzen, Loops, Leitungen, Reaktor) mit DMSO gereinigt. Für diesen Reinigungsvorgang wurde ein generiertes Makro verwendet, das durch Programmierung von Befehlen für die einzelnen Pumpen sowie Angabe der nötigen Zeit einen automatisierten Ablauf des sogenannten „Masterclean“ möglich machte. (Tab. 2.1)

| Masterclean | | |
|-----------------|---|--|
| Time delay (ms) | Pump Action | Comment |
| 0 | /7o6R | Valve F |
| 0 | L3702000000004CL36020000250052 | Concentrator Temp 20 |
| 0 | L3502000020004C | reactor4 temp 20 |
| 0 | L3402000020004B | reactor3 temp 20 |
| 0 | L3302000020004A | reactor2 temp20 |
| 0 | L3202000025004E | reactor1 temp20 |
| 0 | /1o1V10000A0o8V10000A48000o1V10000A0o8V1600A48000R | 2x P1 leeren, mit LM fuellen |
| 0 | /2o1V10000A0o8V10000A48000o1V10000A0o8V1600A0o8V1600A48000R | 2x P2 leeren , mit LM fuellen |
| 0 | /3o1V4000A0o8V4000A48000o1V8000A0o8V800A48000R | 2x P3 leeren, mit LM fuellen |
| 100000 | /1o3V64A28800R | P1: Port C mit 200uL spuelen 40mL/min |
| 0 | /2o3V64A28800R | P2: PortC mit 200uL spuelen 40mL/min |
| 0 | /3o4V160A9600o6V160A0R | P3: Port D (loop ueber reagent line) 800uL: 200uL/min; Port F 200uL: 200uL/min |
| 310000 | /1o8V1600A48000o4V160A0R | P1: Syringe fill; port D 500uL: 100uL/min |
| 0 | /2o8V1600A48000o4V160A0R | P2: syringe fill; port D 500uL: 10uL/min |
| 0 | /3o8V800A48000o5gv700D1M10G14400o2gv700D1M10G14400R | P3: fill syringe; portE-D-C 300uL: 50uL/min; portB 300uL: 50mL/minP3 Move |

Tab. 2.1: Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Masterclean“

Nach dem „Masterclean“ wurden alle Komponenten der Concentrator-Einheit des NanoTek® LF mit Hilfe eines Makros mit der Bezeichnung „Concentratorclean“ gesäubert. Die Reinigung wurde mit Acetonitril durchgeführt. Die dafür notwendigen Befehle sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

| Concentratorclean | | |
|-------------------|---|---------------------------------------|
| Time delay (ms) | Pump action | Comment |
| 0 | Wait | MeCN on line C, all others into waste |
| 2000 | /5o3V3200A12000M1000o1A0o3A12000M1000o1A0o3A12000M1000o2A0o3A12000M1000o2A0R | Clean A&B |
| 50000 | /5o3A12000M1000o4A0o3A12000M1000o4A0o3A12000M1000o6A0o3A12000M1000o6A0R | Clean D&F |
| 50000 | /5o3A12000M1000o5A0o3A12000M1000o5A0o3A12000M1000o5A0R | Clean E |
| 50000 | /5o5V3200A12000M1000o1A0M1000o5A12000M1000o1A0M1000o5V3200A12000M1000o2A0M1000o5A12000M1000o2A0M1000R | Air Purge A&B |
| 50000 | /5o5V3200A12000M1000o4A0M1000o5A12000M1000o4A0M1000o5V3200A12000M1000o6A0M1000o5A12000M1000o6A0M1000R | Air Purge D&F |

Tab. 2.2: Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Concentratorclean“

Während der Ausführung der beiden Makros waren weitere Vorbereitungsschritte nötig. Für die Eluierung von [^{18}F] von der Anionenaustauschersäule wurde eine Lösung von 20 mg Kryptofix 2.2.2 und 4 mg Kaliumcarbonat in 700 μL Acetonitril und 300 μL

Wasser angefertigt (Elutionslösung). Der Precursor Nitroaltanserin wurde je nach gewünschter Konzentration eingewogen und in DMSO gelöst.

2.1.2.2 Produktion von [^{18}F]Fluorid mittels GE PETtrace Zyklotron

Die [^{18}F]Fluorid-Produktion fand in einem GE PETtrace Zyklotron statt. Dabei wurde über eine $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})^{18}\text{F}$ nukleare Reaktion durch Bestrahlung von ^{18}O -angereichertem Wasser (> 98%) mit Protonen schließlich [^{18}F] gewonnen. Der Prozess der Bestrahlung sowie die Abgabe von [^{18}F] wurde über eine Software am Computer gesteuert. Sobald die gewünschte Menge an Radioaktivität erreicht wurde, konnte die Bestrahlung gestoppt werden und das produzierte [^{18}F]Fluorid wurde innerhalb der heißen Zelle in ein Wheaton V-Vial (mit Bleiabschirmung) übergeführt.

Da für die Syntheseveruche mittels NanoTek[®] LF nur eine geringe Menge an Radioaktivität (500 MBq – 3 GBq) notwendig war, wurde zu diesem Zweck hauptsächlich [^{18}F]Fluorid-angereichertes Spülwasser verwendet. Dazu wurden nach der täglichen [^{18}F]FDG-Synthese die [^{18}F]-Leitungen mit Wasser gespült und so die verbliebene ^{18}F -Aktivität gewonnen und ebenfalls in ein Wheaton V-Vial übergeführt.

Da das [^{18}F]Fluorid in Wasser vorlag und in diesem Zustand nicht nukleophil substituiert werden konnte, waren weitere, im folgenden Kapitel erläuterte, Schritte notwendig.

2.1.2.3 Fixierung auf dem Anionentauscher, Elution und Azeotrope Trocknung

Die azeotrope Trocknung sowie die nachfolgende Synthese von [^{18}F]Altanserin wurde mit Hilfe des Mikrofluidsystems Advion NanoTek[®] LF durchgeführt.

Zuerst wurde das [^{18}F]Fluorid-enthaltende Spülwasser über eine Anionentauschersäule gedrückt, wobei [^{18}F]Fluorid auf der Säule zurückgehalten wurde und das Wasser in ein Sammelgefäß (Concentrator-Vial) geleitet wurde. Nach Entfernung des Wassers aus dem Concentrator-Vial durch Rückleitung in das ursprüngliche Gefäß wurde [^{18}F]Fluorid mit 1 mL einer Lösung von Kryptofix 2.2.2/Kaliumcarbonat (20 mg/4 mg) in Acetonitril/Wasser im Verhältnis 70:30 (v/v%) von der Anionentauschersäule (Chromafix PS- HCO_3^-) in das Concentrator-Vial eluiert. Das Kation von Kaliumcarbonat bildet hierbei mit dem Aminopolyether Kryptofix 2.2.2 einen Komplex, bei dem [^{18}F]Fluorid als Gegenion fungiert, sodass dieser Komplex während und nach der Trocknung mit [^{18}F]Fluorid in die organische Phase übergeführt werden kann. Diese Lösung wurde auf 110°C erhitzt und durch Zugabe von 2x je 500 µL Acetonitril im Inertgas-Strom N_2 azeotrop getrocknet.

Durch das Prinzip der azeotropen Trocknung ist es möglich, Wasser leichter aus einer Reaktionslösung zu entfernen. Der Siedepunkt von Acetonitril liegt bei 81.6°C, der des Wassers bei 100°C. Beide Flüssigkeiten zusammen können ein Azeotrop bilden, das bei 76.1°C kocht und sich aus 86% Acetonitril und 14% Wasser zusammensetzt. [83] Nach der azeotropen Trocknung wurde der getrocknete [¹⁸F]Fluorid-Kalium-Kryptofix 2.2.2-Komplex durch Zugabe von 500 µL DMSO abermals gelöst und konnte in diesem Zustand für die nukleophile Substitution verwendet werden.

Auch für den Ablauf der azeotropen Trocknung wurde ein generiertes Makro verwendet, dessen Befehle in Tabelle 2.3 aufgelistet sind.

| Azeotropic drying | | |
|-------------------|--|---|
| Time delay (ms) | Pump action | Comment |
| 0 | Wait | Batch FDG: SBFDG_v35; Plumbing: SBFDGv2_1 ; 3-Channel Reactor; 500 uL run, ;N2 Flow set to 1.5 scfh |
| 0 | /3o8V4000A48000R | P3 : fill syringe |
| 0 | L3702000100004DL3602000300004E | Heat concentrator 1 up to 100 C |
| 1000 | /5go1V3200A12000M2000o5V1200A0M500G3go6V6400A12000M1000o1A0G4R | CE: Load Target Water |
| 120000 | /7U2M5000U1M5000u2R | G: Turn on Nitrogen |
| 10000 | /5o2V1000P12000o5V1000D12000R | CE: add 1ml K222 |
| 60000 | /5o3V2000A6000M2000o5V75D4800o6V75D1200o2V2000A0R | CE: Add 0.5 mL MeCN |
| 10000 | L3702000110004EL3602000300004E | Heat concentrator 1 up to 110C |
| 200000 | /5o3V200P6000o5gv650D1M24G6000R | CE: Add 0,5 mL MeCN |
| 200000 | L37020000260054L3602000300004E | CE: Set Heater to 26oC |
| 150000 | /7u1R | G: Turn off Nitrogen |
| 1000 | /3o6V10000D24000R | P3: solve Activity in 500uL solvent |

Tab. 2.3: Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Azeotropic drying“

2.1.2.4 Synthese: Praktische Durchführung der Optimierungsreaktionen mit einem Advion Nanotek® LF

Nach Beendigung der azeotropen Trocknung waren noch einige Schritte notwendig, bevor die Radiosynthese beginnen konnte. Dabei behalf man sich Funktionen aus dem „Discovery Mode“ des NanoTek® LF, die manuell angesteuert wurden (Abb. 2.2). Zuerst wurde sowohl die Precursor-Lösung, als auch die [¹⁸F]Fluorid – Kryptofix 2.2.2/K⁺-Lösung über die Pumpe 1 und die Pumpe 3 bis zum Beginn der jeweiligen Loop aufgezogen („Prime“). Anschließend wurden durch den Befehl „Fill“ die Loop der Pumpe 1

mit Precursor-Lösung und die Loop der Pumpe 3 mit [^{18}F]Fluorid – Lösung vollständig gefüllt. Die Leitungen von Pumpe 1 und Pumpe 3 von der Loop zum Reaktor konnten über die Funktion „Load“ mit den jeweiligen Reaktandenlösungen beladen werden.

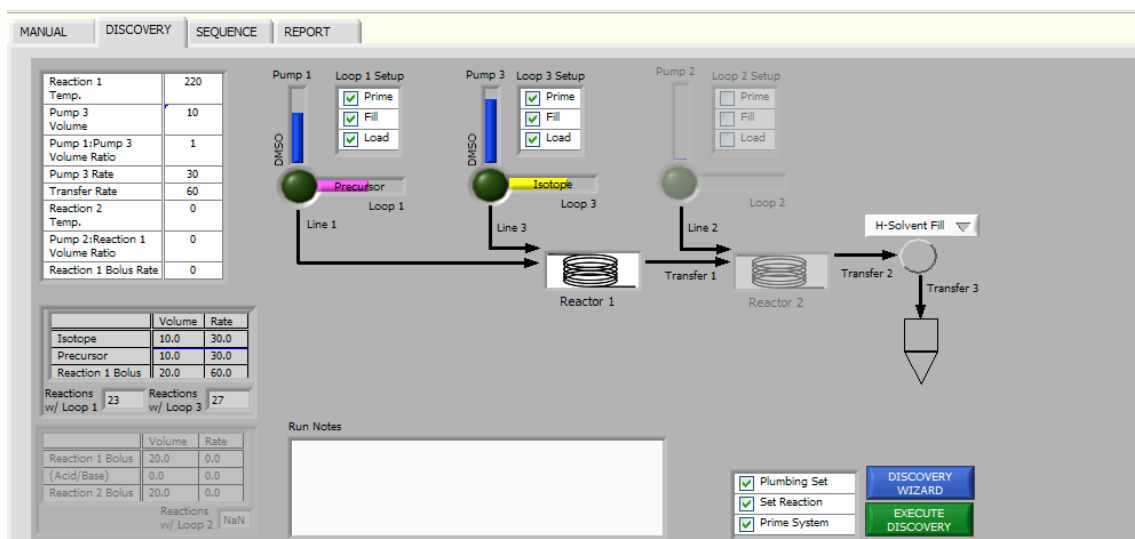


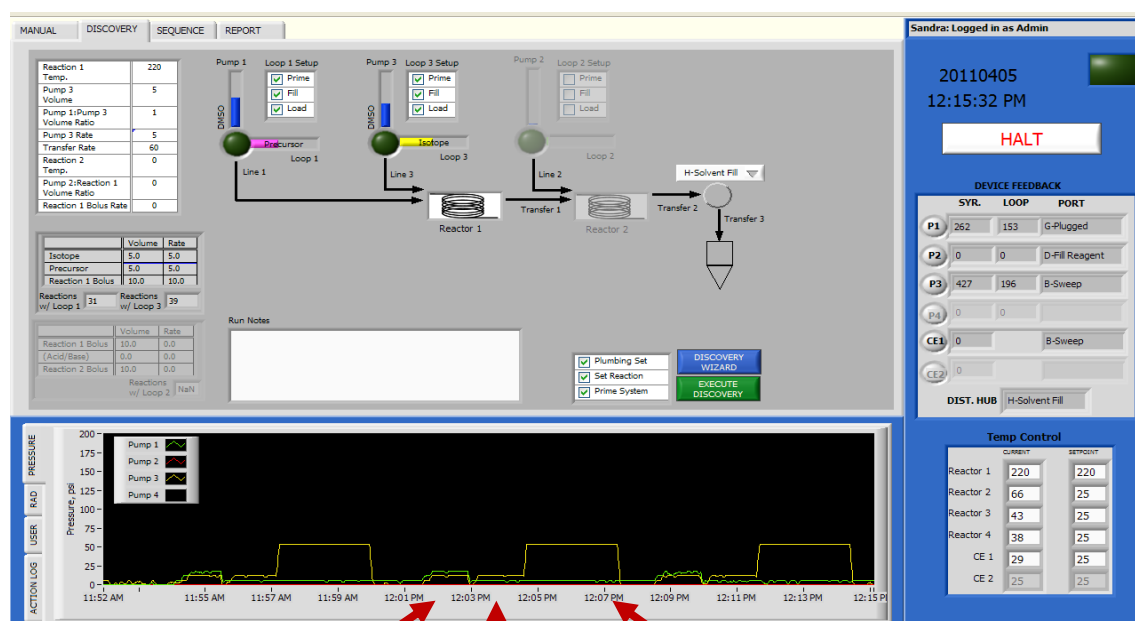
Abb. 2.2: Screenshot des “Discovery” Modes des Advion NanoTek[®] LF

Nach den Vorbereitungsschritten konnten die Syntheseversuche gestartet werden. Durch manuelle Eingabe der Reaktionstemperatur, des Volumens der Pumpe 3, des Volumenverhältnisses von Pumpe 1 und Pumpe 3 (standardmäßig 1:1) sowie der Durchflussgeschwindigkeit durch den Reaktor konnten die gewünschten Reaktionsbedingungen bestimmt werden (Abb. 2.2 im weißen Kästchen). Nach Anklicken des grünen Buttons „Execute Discovery“ wurde die Synthese gestartet. Dabei wurden die gewählten Volumina beider Flüssigkeiten mit der eingegebenen Durchflussgeschwindigkeit durch den temperaturgeregelten Reaktor gedrückt, in dem die Reaktion stattfand. Das Reaktionsprodukt wurde mit 300 μL DMSO aus dem Reaktor in ein Sammelgefäß (Eppendorf-Gefäß oder Wheaton V-Vial) gespült („final sweep“).

Die Aufgabenstellung meiner Diplomarbeit war, optimale Reaktionsbedingungen zu finden, um eine größtmögliche Ausbeute an [^{18}F]Altanserin zu erzielen. Die Reaktionsparameter, die es zu untersuchen galt, waren Precursor-Konzentration, Reaktionstemperatur und Durchflussgeschwindigkeit. Die Reaktionstemperatur wurde im Bereich zwischen 25°C und 220°C variiert, für den Precursor wurden Konzentrationen im Bereich zwischen 1 mg/mL und 6.6 mg/mL (in Reaktionslösung) gewählt, und die Durchflussgeschwindigkeiten während der Reaktionen lagen zwischen 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ und 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ pro Pumpe (entsprechend 10-60 $\mu\text{L}/\text{min}$ Gesamtdurchflussgeschwindigkeit).

Im Laufe meiner Arbeitszeit stellte sich heraus, dass die eingesetzten Reaktionsvolumina von [^{18}F]Fluorid- und Precursorlösung ebenfalls einen Einfluss auf die radio-chemische Inkorporation haben, sodass auch dieser Parameter bei den einzelnen Synthesen berücksichtigt werden musste. Dementsprechend wurden Volumina im Bereich zwischen 5 μL und 400 μL eingesetzt. Da die Loops der beiden Pumpen mit jeweils rund 400 μL Precursor bzw. [^{18}F]Fluoridlösung gefüllt werden können, können bei einem Pumpvolumen von 5 μL pro Pumpe theoretisch 80 Synthesen an einem Tag durchgeführt werden.

Der Verlauf einer Reaktion kann über die Druckkurven der Sensoren in den Pumpen aufgezeichnet und ausgewertet werden. Diese liefern auch Aufschluss über mögliche Probleme im System, zum Beispiel führt das Auskristallisieren im Reaktor zu einer Verstopfung und im weiteren Verlauf zu einem Druckanstieg. In Abbildung 2.3 sind die typischen Druckkurven einer Serie von Reaktionen dargestellt. Hier wurden 5 μL [^{18}F]Fluorid-Lösung und 5 μL Precursor-Lösung gleichzeitig mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch den 200°C heißen Reaktor gedrückt. Danach wurde das Reaktionsgemisch über die Pumpe 3 aus dem Reaktor hinausgespült. Im letzten Schritt wurde das System mit DMSO gereinigt und die Produktlösung mit 300 μL DMSO in ein Sammelgefäß gespült.



Reaktion: Precursor (Pumpe 1) und [^{18}F]Fluorid (Pumpe 3) werden gleichzeitig in den Reaktor gedrückt

Sweep: die Reaktionsmischung wird über die Pumpe 3 aus dem Reaktor gespült

Final Sweep: die Reaktionsmischung gelangt in das Sammelgefäß, mit DMSO wird nachgespült

Abb. 2.3: Darstellung des Reaktionsverlaufs mittels Druckkurven von Pumpe 1 und Pumpe 3

2.1.2.5. Erstellung eines Programms für den automatisierten Syntheseablauf mittels Advion NanoTek® LF

Nach einer Vielzahl von Synthesen konnten schließlich die optimalen Reaktionsbedingungen für eine größtmögliche radiochemische Inkorporation ermittelt werden. Die höchste Ausbeute an [^{18}F]Altanserin konnte mit einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL, einer Reaktionstemperatur von 220°C und einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pro Pumpe erzielt werden. Dies entspricht einer Gesamtgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ für beide Pumpen. Mit dieser Erkenntnis wurden, zusätzlich zum Masterclean, Concentratorclean und der azeotropen Trocknung, drei Makros generiert, die einen automatisierten Syntheseablauf gewährleisten. Dafür wurde das gesamte Fassungsvermögen beider Loops (je 400 μL Precursor-Lösung bzw. [^{18}F]Fluorid-Lösung) verwendet.

Eine automatisierte Vollsynthese beinhaltete folgende Makros, die aneinander gereiht wurden:

- (1) Azeotropic drying (Tab 2.3)
- (2) Temperature control (Tab 2.4)
- (3) Load (Tab 2.5)
- (4) Reaction (Tab 2.6)

Für die azeotrope Trocknung wurde das gleiche Makro wie bei den Optimierungsreaktionen (Kapitel 2.1.2.4) verwendet.

Das Makro „Temperature control“ umfasste lediglich die Aufheizung des Reaktors auf die gewünschten 220°C Reaktionstemperatur. (Tab. 2.4)

| Temperature control | | |
|---------------------|-----------------|--------------------|
| Time delay (ms) | Pump Action | Comment |
| 0 | L32020002200050 | Reaktor 1 auf 220C |

Tab. 2.4: Programmierter Code zur Ausführung des Macros „Temperature control“

Mit Hilfe des Makros „Load“ wurden die Loops von Pumpe 1 und Pumpe 3 mit Precursor-Lösung bzw. [^{18}F]Fluorid-Lösung befüllt (Tab. 2.5). Im Unterschied zur Pumpe 1, die 500 μL Precursor-Lösung mit 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ über eine Spritze aufzog, wurden über die Pumpe 3 zunächst 300 μL [^{18}F]Fluorid-Lösung aus dem Concentrator-Vial entnommen, dann wieder abgeben und anschließend ebenfalls 500 μL mit 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ aufgezogen. Dadurch sollte eine bessere Durchmischung der [^{18}F]Fluorid-Lösung erreicht werden.

| Load | | |
|-----------------|---|---|
| Time delay (ms) | Pump Action | Comment |
| 0 | /1o1V1600A0o4V160A48000R | P1: leeren, D 500ul mit 100ul/min, |
| 0 | /3o1V800A0o4V80A14400o4V800A0o4V80A24000o8V800A48000R | P3: leeren, D 300ul mit 100ul/min, 0 mit 1000ul/min, D 500ul mit 100ul/min, P3 auf 1000ul gefüllt |

Tab. 2.5: Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Load“

Durch die Pumpenbefehle des letzten Makros (Tab. 2.6) konnte die Reaktion der beiden Lösungen ablaufen. Nach dem Laden zum Reaktor (43 µL Precursor-Lösung bzw. 16 µL [¹⁸F]Fluorid-Lösung mit 100 µL/min), konnte die Reaktion mit je 400 µL Reaktionslösung pro Pumpe mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 20 µL/min (Overall Flow) ablaufen. Zum Schluss wurde das Reaktionsgemisch mit 300 µL DMSO aus dem Reaktor gespült und dieser auf 20°C abgekühlt.

| Reaction | | |
|-----------------|--|---|
| Time delay (ms) | Pump Action | Comment |
| 0 | L32020002200050 | Reaktor 1 auf 220C |
| 2000 | /1o5V160A43872R | P1: E 43ul mit 100ul/min (load) |
| 30000 | /3o5V80A47232R | P3: E 16ul mit 100ul/min (load) |
| 18000 | /1o5ggv700D1M48G19200G2o5V80D5472R | P1 E 400ul mit 10ul/min, 57ul mit 50ul/min |
| 0 | /3o5gv700D1M110G19200o5gv700D1M10G2736o5V80D14400R | P3 E 400ul mit 10ul/min, 57ul mit 50ul/min, 300ul mit 100ul/min |
| 2500000 | L32020000200049 | Reaktor 1 auf 20C |

Tab. 2.6: Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Reaction“

Die besten Ergebnisse wurden bei einer Gesamtgeschwindigkeit von 10 µL/min erzielt, jedoch wurden unter Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls von [¹⁸F]Fluorid und der radiochemischen Ausbeute für die Programmierung der Reaktion eine doppelt so hohe Durchflussgeschwindigkeit gewählt. Nur geringfügig schlechtere Ausbeuten konnten bei den Vorversuchen bei 20 µL/min erzielt werden (12.5 ± 1.0% bei 10 µL/min vs. 9.3 ± 0.6% bei 20 µL/min; bezogen auf 2 mg/mL, 220°C und 5 µL Reaktionsvolumen pro Pumpe). Allerdings konnte durch die höhere Geschwindigkeit die Synthesedauer um die Hälfte verkürzt werden, was bei einer vollen Synthese mit einem Gesamtvolumen von 800 µL (400 µL Precursorlösung und 400 µL [¹⁸F]Fluoridlösung) eine Reaktionsdauer von 80 Minuten bei 10 µL/min oder 40 Minuten bei 20 µL/min bedeutet.

2.1.2.6 Qualitätskontrolle und Ermittlung der radiochemischen Inkorporation

Die Qualitätskontrolle wurde sowohl mittels Dünnschichtchromatographie (DC), als auch mit Hilfe einer analytischen HPLC (High Performance Liquid Chromatography =

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) durchgeführt. Die Dünnschichtchromatographie diente zur Quantifizierung der radiochemischen Inkorporation sowie zur Bestimmung von potentiellen Nebenprodukten, während mittels analytischer HPLC die Identität des Produktes und dessen radiochemische Reinheit festgestellt werden konnte.

Für die Qualitätskontrolle mittels DC wurden Platten aus Kieselgel (TLC Silica gel 60 F₂₅₄) verwendet, die mit einem Laufmittel der Zusammensetzung Acetonitril/Wasser 80:20 (v/v%) entwickelt wurden. Ein entsprechendes DC-Chromatogramm ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

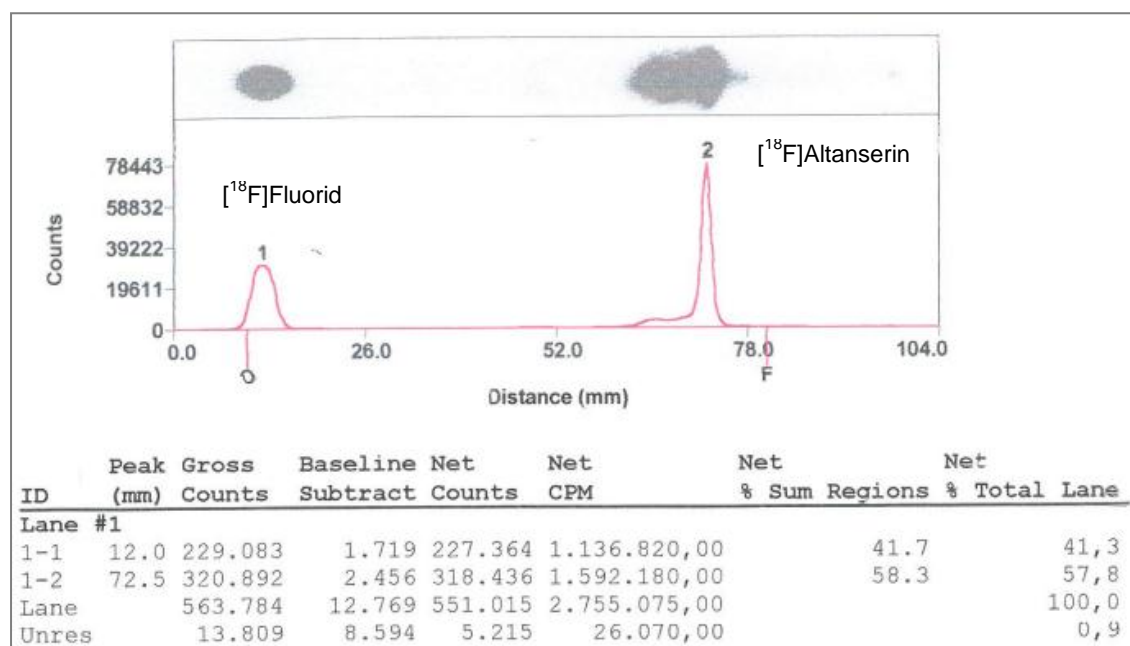


Abb. 2.4: Chromatographische Auftrennung von [¹⁸F]Fluorid und [¹⁸F]Altanserin mittels DC

Das freie [¹⁸F]Fluorid wurde am Auftragepunkt retiniert, während [¹⁸F]Altanserin weniger stark retiniert wurde ($R_f = 0.75 \pm 0.03$). Dadurch konnte eine gute Trennung der beiden Komponenten erreicht werden. Durch Auswertung der DC-Platten mit einem Autoradiograph konnten beide Substanzen quantifiziert werden und die radiochemische Inkorporation bestimmt werden. Der Precursor Nitroaltanserin konnte dünnenschichtchromatographisch nicht nachgewiesen werden, da mit einem Autoradiographen nur radioaktive Substanzen detektiert werden können.

Die Qualitätskontrolle mittels analytischer HPLC wurde mit der Säule Phenomenex Gemini 3μ C-18 (110A, 150 x 4.60 mm, 3 micron) durchgeführt. Für die Analyse wurde eine Laufmittelzusammensetzung von Ammoniumacetat-Puffer (24 mmol, pH 5.4)/Acetonitril 59:41 (v/v%) und ein Flow von 1 mL/min gewählt. Die radioaktiven Komponenten konnten mit Hilfe eines NaI-Kristall-Detektors dargestellt werden, wäh-

rend Nitroaltanserin (und alle anderen nicht-radioaktiven Substanzen) mit einem UV-Detektor der Wellenlänge 254 nm detektiert wurde(n). Ein entsprechendes HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

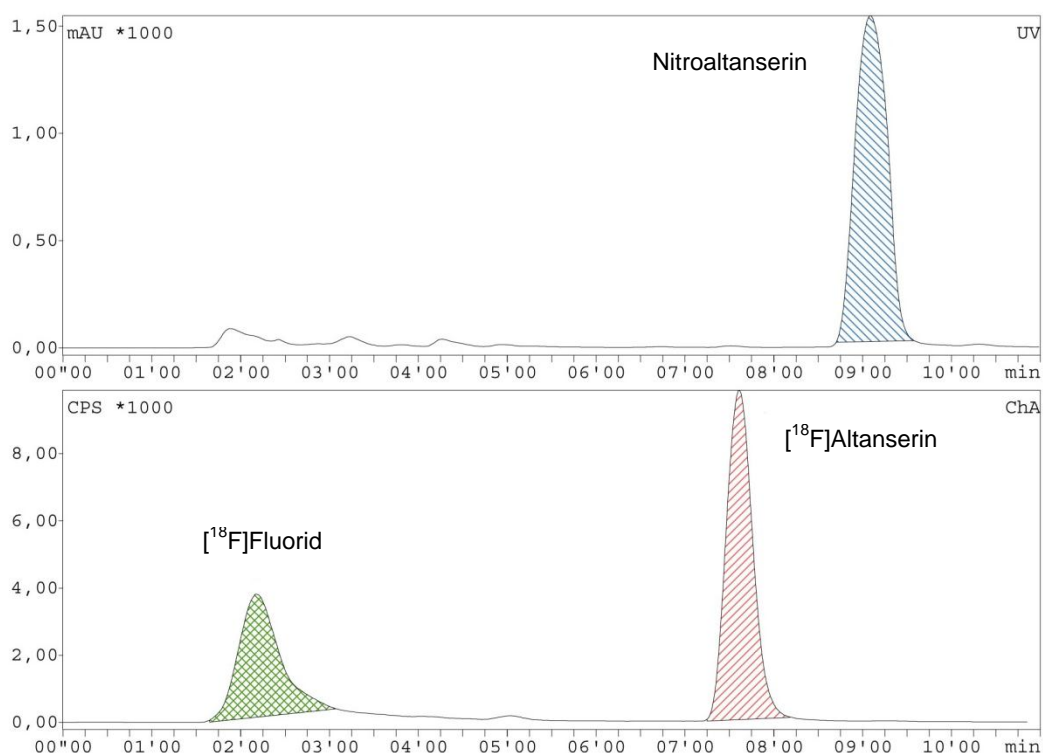


Abb. 2.5: Analytisches HPLC-Chromatogramm zur Identifizierung der einzelnen Komponenten in Reaktionslösung (obere Reihe: UV-Kanal, untere Reihe: Radioaktivitätskanal)

Durch dessen Hydrophilie wurde $[^{18}\text{F}]$ Fluorid unmittelbar nach Einspritzen in die Säule eluiert ($t_R = 2.08$ min), während $[^{18}\text{F}]$ Altanserin nach $t_R = 7.36$ min und Nitroaltanserin nach $t_R = 9.05$ min eluiert wurden.

Alle Syntheseprodukte eines Triplets wurden dünnschichtchromatographisch ausgewertet, während nur für ein Produkt eines Triplets ein HPLC-Chromatogramm angefertigt wurde.

2.1.2.7 Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit verschiedener Reaktionsparameter

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für eine größtmögliche radiochemische Inkorporation zu ermitteln, wurden die Reaktionsparameter Precursor-Konzentration, Temperatur, Durchflussgeschwindigkeit und Volumen untersucht. Alle Versuche wurden jeweils im Triplikat durchgeführt. Die Bezeichnung Precursor-Konzentration bezieht sich immer auf die Konzentration in Reaktionslösung.

Folgende Precursor-Konzentrationen wurden für Synthesversuche eingesetzt: 1 mg/mL, 2 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3 mg/mL, 3.3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL und 6.6 mg/mL. Im Rahmen der Vorbereitung für die Synthese wurde eine bestimmte Konzentration an Nitroaltanserin hergestellt und in die Loop injiziert. Diese Konzentration konnte jedoch durch Veränderung des Verhältnisses des Pumpvolumens von Pumpe 1 und Pumpe 3 variiert werden. (Tab. 2.7)

| Precursor-Konzentration | Verhältnis Pumpe 1:Pumpe 3 | Konz. in Reaktionslösung |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 10 mg/mL | 1 | 5 mg/mL |
| | 0.5 | 3.3 mg/mL |
| | 2 | 6.6 mg/mL |

Tab. 2.7: Abhängigkeit der Precursor-Konzentration in Reaktionslösung vom Verhältnis Pumpe 1: Pumpe 3

Diese Funktion machte es möglich, dass drei unterschiedliche Konzentrationen an einem Tag getestet werden konnten.

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur wurden folgende in Synthesversuchen ausgetestet: 25°C, 180°C, 200°C und 220°C. Bei den Versuchen mit einer Precursor-Konzentration von 2.5 mg/mL, 10 µL Volumen und einer Gesamtdurchflussgeschwindigkeit von 40 µL/min bei Raumtemperatur wurde so gut wie kein Umsatz zu [¹⁸F]Altanserin festgestellt ($0.1 \pm 0.14\%$), daher wurden die anderen Konzentrationen ausschließlich bei 180, 200 und 220°C getestet. Da selbst bei 180°C die radiochemische Inkorporation durchwegs unter 15% lag, wurden im Temperaturbereich zwischen 25°C und 180°C keine Versuche durchgeführt.

Folgende Durchflussgeschwindigkeiten wurden im Rahmen von Versuchen eingesetzt: 10 µL/min, 15 µL/min, 16 µL/min, 20 µL/min, 40 µL/min und 60 µL/min. Diese Werte beziehen sich auf eine Gesamtgeschwindigkeit, die die Pumpgeschwindigkeiten beider Pumpen (Pumpe 1 und 3) umfasst. Eine Durchflussgeschwindigkeit von 10 µL/min bedeutet, dass die Reaktionslösungen sowohl von Pumpe 1 als auch von Pumpe 3 mit einer Geschwindigkeit von 5 µL/min durch den Reaktor gedrückt wurden.

Da sich im Laufe der Arbeitszeit herausgestellt hat, dass auch die Volumina der Precursor- und [¹⁸F]Fluoridlösungen die Syntheseergebnisse entscheidend beeinflussen, wurde auch dieser Parameter für die Evaluierung herangezogen. Folgende

Volumina wurden bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ausgetestet: 5, 10, 30, 120, 180, 400 μL .

Die dazugehörigen Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt detailliert erläutert.

2.1.3 Ergebnisse

2.1.3.1 Precursor-Konzentration

In Abbildung 2.6 sieht man die radiochemische Inkorporation (RCIY) in Abhängigkeit der Precursor-Konzentration bei 220°C und einer Gesamtflussrate von 15 μL (bei 3.3 mg/mL und 6.6 mg/mL) bzw. 16 μL (bei 5 mg/mL). Die eingesetzten Volumina von Precursor- und $[^{18}\text{F}]$ Fluorid-Lösung lagen zwischen 5 μL und 10 μL . Ein sinkender Produktumsatz bei steigender Precursor-Konzentration ist deutlich erkennbar.

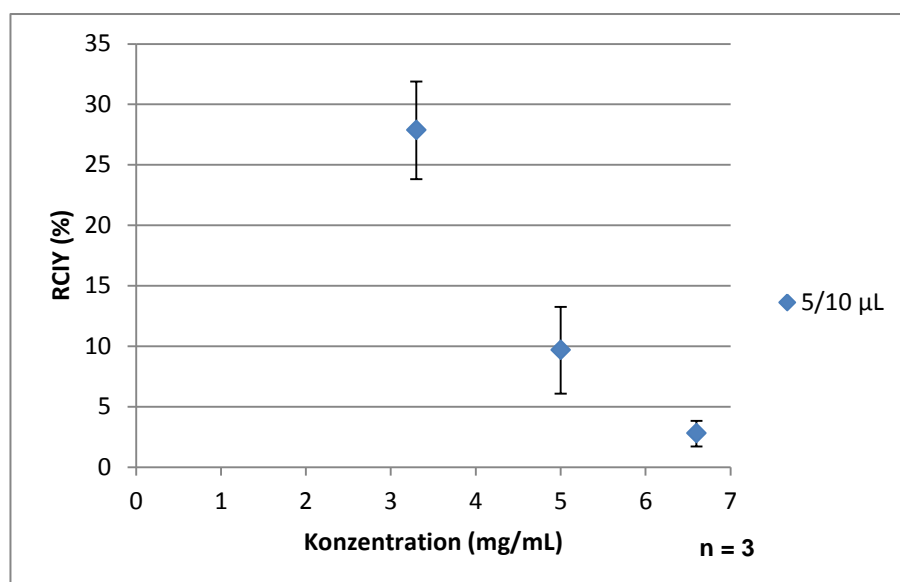


Abb. 2.6: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit der Precursor-Konzentration bei 220°C , einem Volumen von 5 bzw. 10 μL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 15 (16) $\mu\text{L}/\text{min}$

Die besten Ergebnisse konnten bei einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL erzielt werden, was die folgenden Abbildungen (Abb. 2.7 und Abb. 2.8) illustrieren. Höhere Konzentrationen zeigten durchwegs einen verminderten Umsatz.

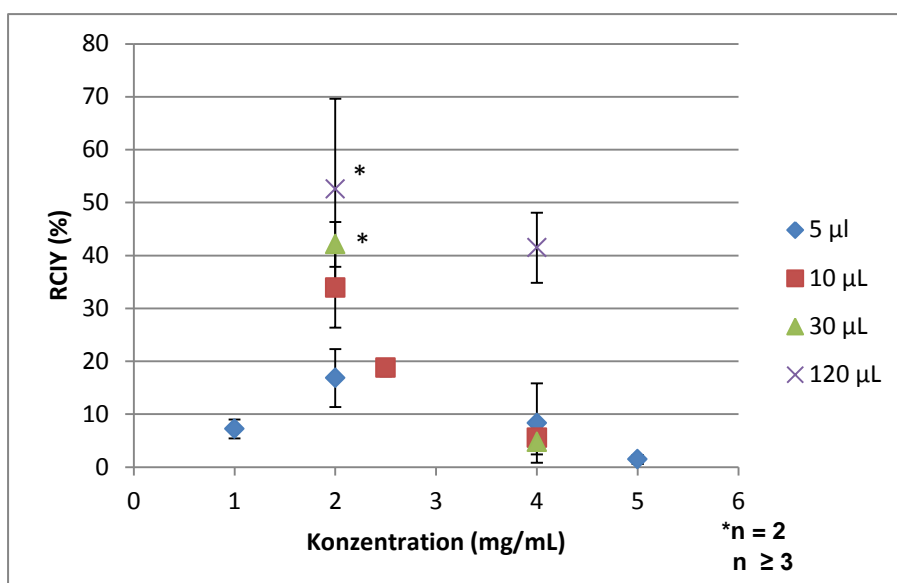


Abb. 2.7: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit der Precursor-Konzentration bei 220°C, 10 µL/min Durchflussgeschwindigkeit und unterschiedlichen Volumina (5, 10, 30 und 120 µL)

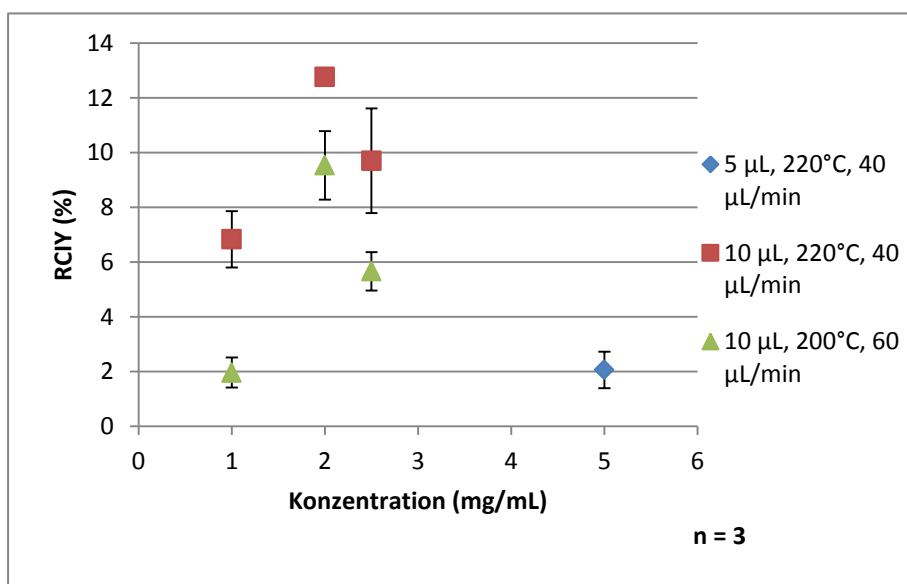


Abb. 2.8: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit der Precursor-Konzentration bei 200°C bzw. 220°C, 40 bzw. 60 µL/min Durchflussgeschwindigkeit und Volumina von 5 µL bzw. 10 µL

2.1.3.2 Temperatur

Bei allen Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlichen Durchflussgeschwindigkeiten konnte man eine Erhöhung der radiochemischen Inkorporation mit steigender Reaktionstemperatur erkennen (Abbildung 2.9 - 2.11). Die jeweils besten Synthesergebnisse wurden bei 220°C erzielt.

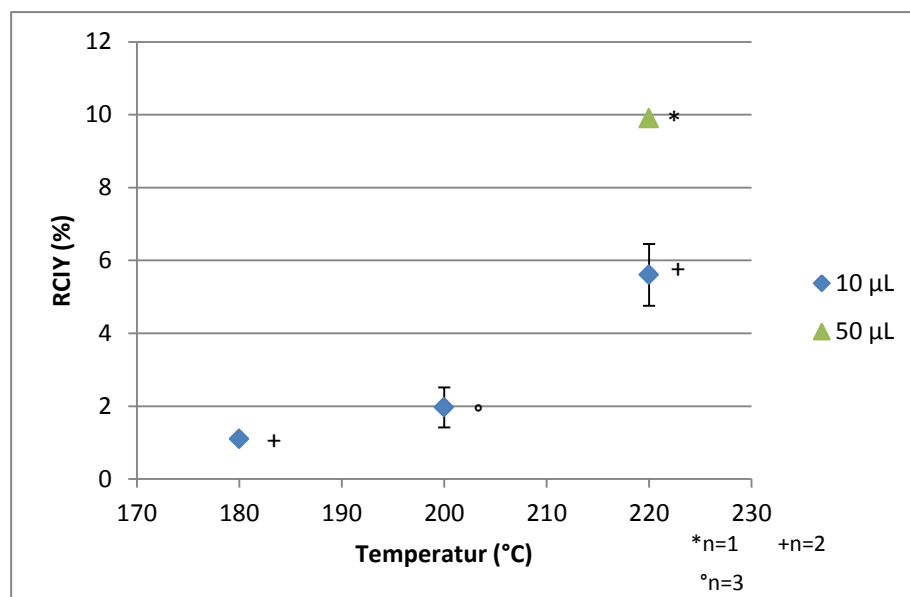


Abb. 2.9: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei einer Precursor-Konzentration von 1 mg/mL, einem Volumen von 10 bzw. 50 µL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 60 µL/min

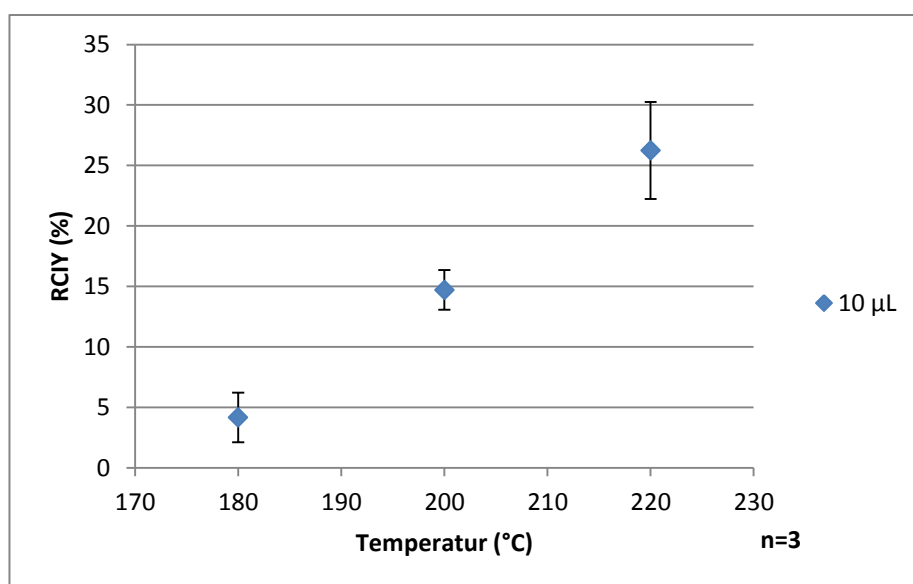


Abb. 2.10: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei einer Precursor-Konzentration von 2.5 mg/mL, einem Volumen von 10 µL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 20 µL/min

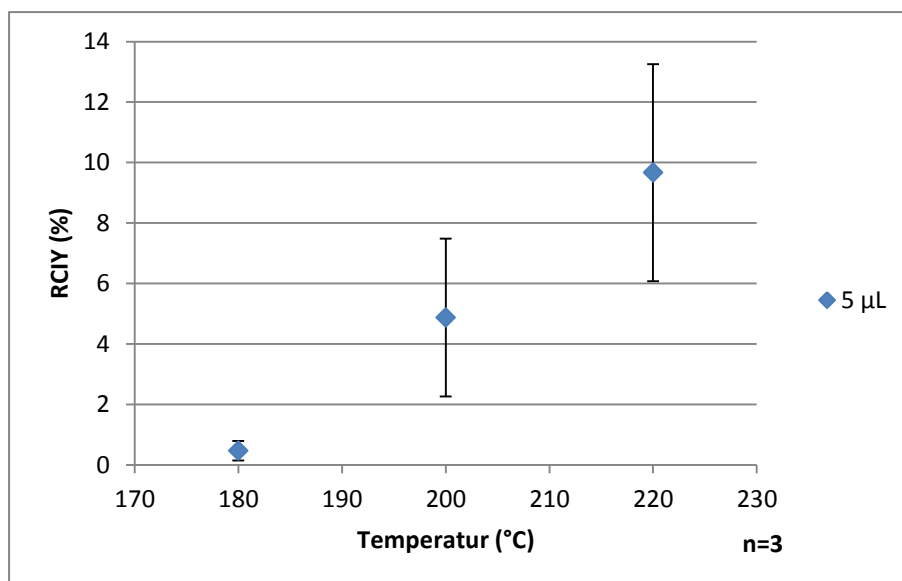


Abb. 2.11: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei einer Precursor-Konzentration von 5 mg/mL, einem Volumen von 5 µL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 16 µL/min

In Abbildung 2.12 sieht man zusätzlich zum steigenden Produktumsatz bei steigender Temperatur eine Tagesabhängigkeit der Ergebnisse. Die im Diagramm dargestellten Versuche wurden jeweils als Triplet an zwei verschiedenen Tagen mit gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Man sieht deutlich unterschiedliche radiochemische Inkorporationen an beiden Tagen, wobei jedoch beide Datenreihen denselben Trend zeigen. Die Problematik der Tagesabhängigkeit der Ergebnisse wird in Kapitel 2.1.4 näher erläutert.

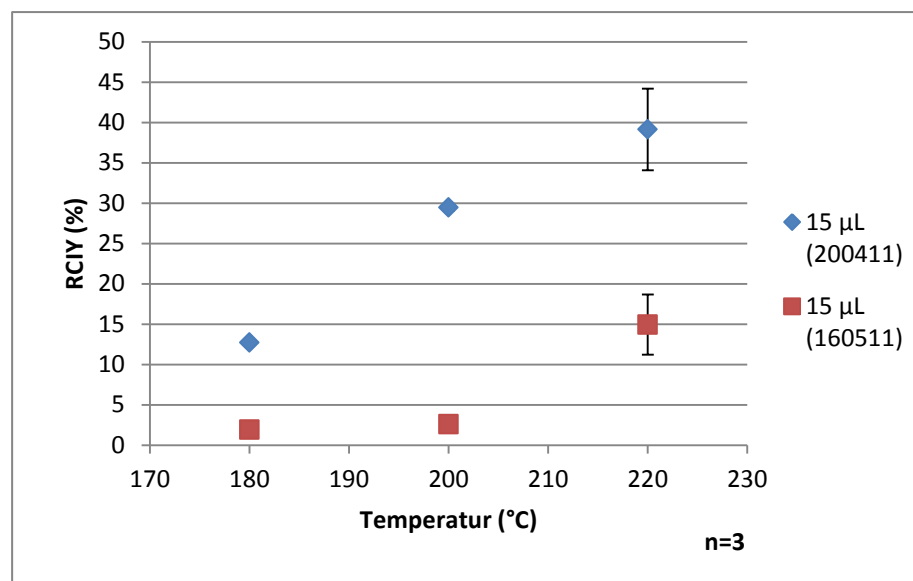


Abb. 2.12: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL, einem Volumen von 15 µL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 15 µL/min. Die dargestellten Versuche wurden an zwei unterschiedlichen Tagen (20.04.2011 und 16.05.2011) durchgeführt.

2.1.3.3 Durchflussgeschwindigkeit (Flow)

Die Abbildungen 2.13 und 2.14 zeigen die Ergebnisse bei den Reaktionsparametern 1 mg/mL, 220 bzw. 180°C und 5 bzw. 10 µL Volumen. Das erste Diagramm zeigt die höchste radiochemische Inkorporation bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 20 µL/min, in der zweiten Graphik sieht man mit steigender Durchflussgeschwindigkeit abfallende Werte.

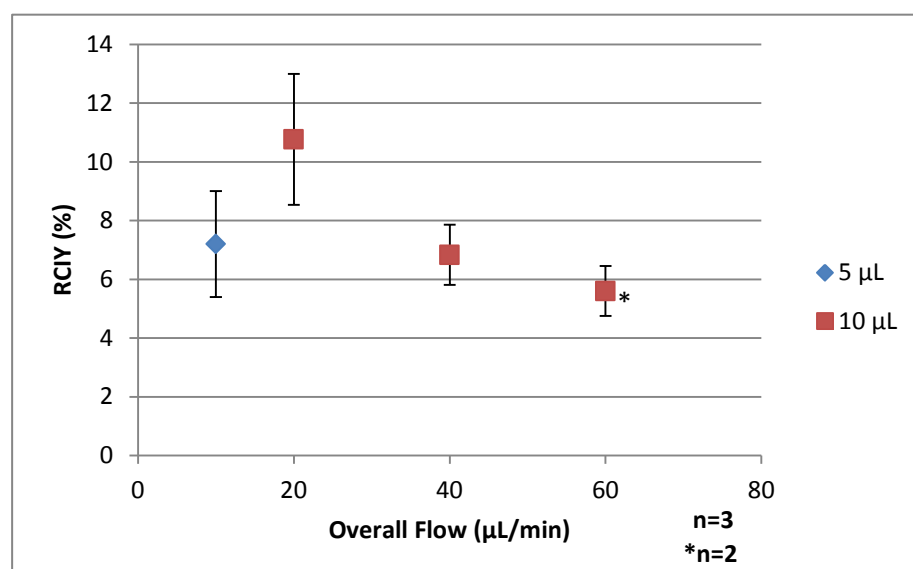


Abb. 2.13: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit bei einer Precursor-Konzentration von 1 mg/mL, einer Temperatur von 220°C und einem Volumen von 5 bzw. 10 µL

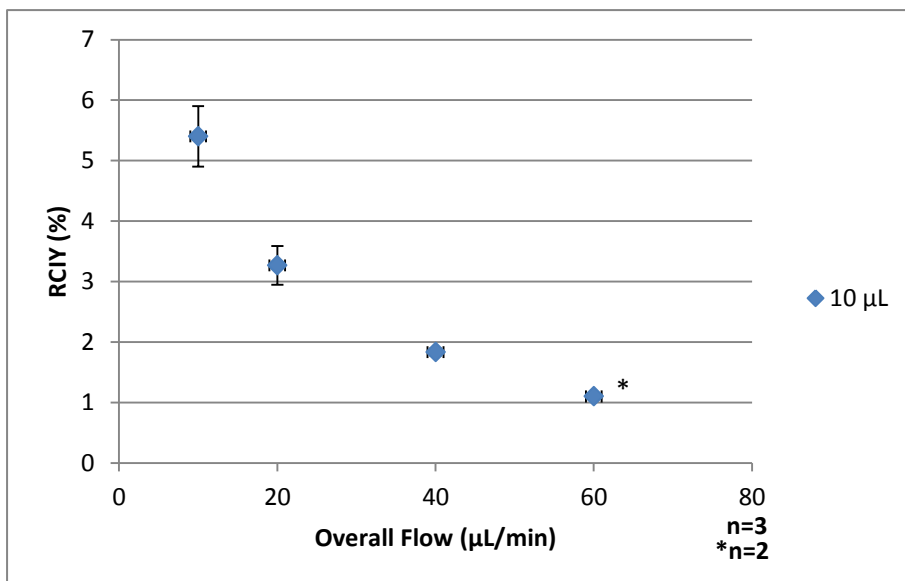


Abb. 2.14: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit bei einer Precursor-Konzentration von 1 mg/mL, einer Temperatur von 180°C und einem Volumen von 10 μL

Die folgenden Abbildungen zeigen ähnliche Ergebnisse wie die ersten beiden Grafiken, allerdings sieht man hier bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 60 μL/min bessere radiochemische Umsätze als vergleichsweise bei 40 μL/min. Diese Tatsache lässt vermuten, dass in diesem Zusammenhang eventuell die Konzentration an Precursor eine Rolle spielen könnte.

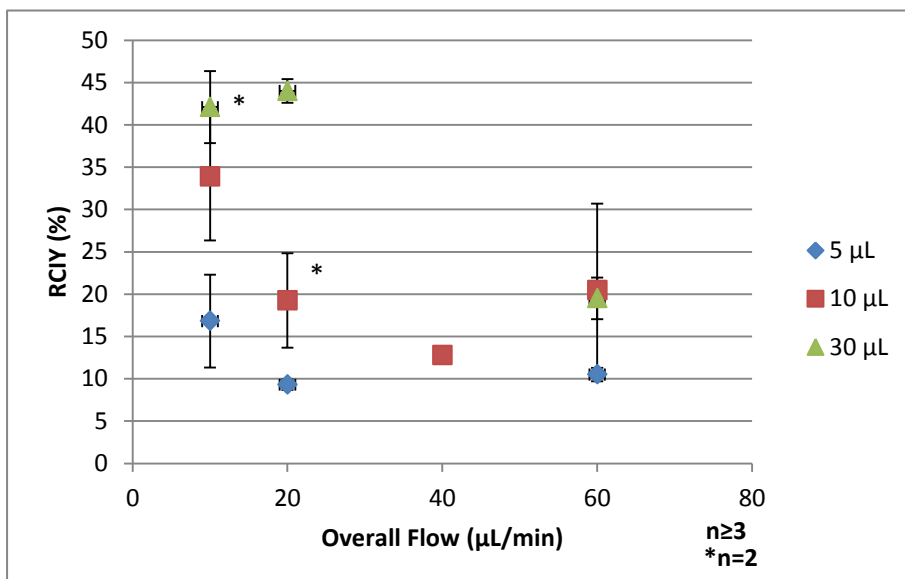


Abb. 2.15: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit bei einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL, einer Temperatur von 220°C und einem Volumen von 5, 10 bzw. 30 μL

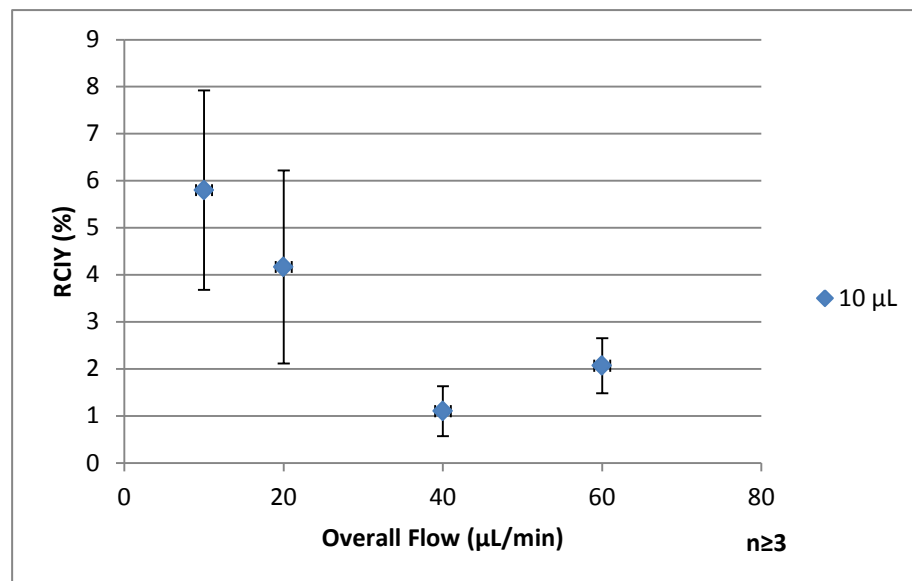


Abb. 2.16: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit bei einer Precursor-Konzentration von 2.5 mg/mL, einer Temperatur von 180°C und einem Volumen von 10 μL

Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass grundsätzlich bei der niedrigsten Durchflussgeschwindigkeit durch den Reaktor (10 μL) die besten radiochemischen Inkorporationen verzeichnet wurden.

2.1.3.4 Volumen

Grundsätzlich ist man davon ausgegangen, dass die eingesetzten Reaktionsvolumina von Precursor und [^{18}F]Fluorid die radiochemische Inkorporation nicht beeinflussen und beliebig gewählt werden können. Im Laufe der Arbeitszeit stellte sich jedoch heraus, dass mit steigendem Volumen auch die Produktausbeute steigt, was vor allem bei den besten Reaktionsbedingungen (Reaktionstemperatur 220°C, Precursor-Konzentration 2 mg/mL) gut zu beobachten war.

In den Abbildungen 2.17 und 2.18 sind die Ergebnisse bei unterschiedlichen Reaktionsvolumina (5, 10, 30, 120, 180, 400 μL) unter Variation der Durchflussgeschwindigkeit bei 220°C und einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL dargestellt. Die höchsten Umsätze sind bei der niedrigsten Durchflussgeschwindigkeit (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) und steigendem Volumen zu verzeichnen (siehe auch Abb. 2.7).

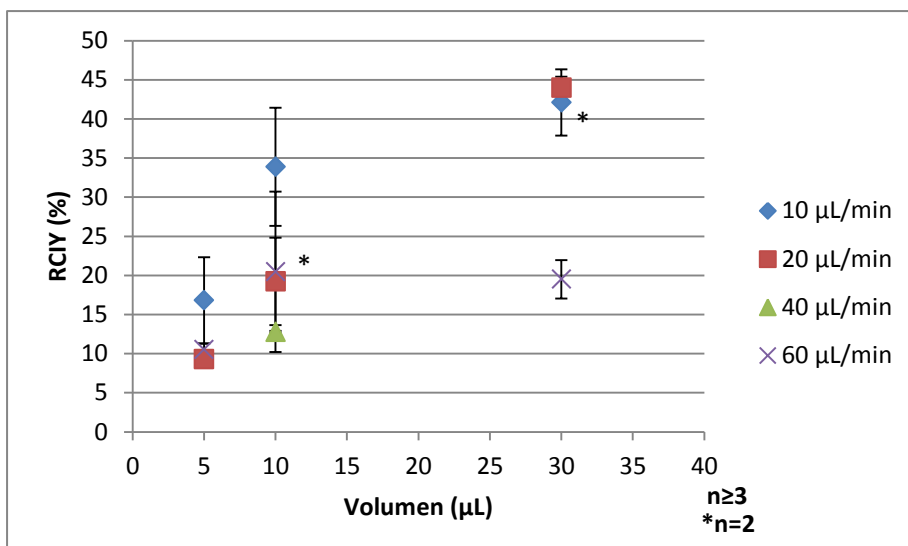


Abb. 2.17: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit vom Volumen bei einer Reaktionstemperatur von 220°C, einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 10, 20, 40 und 60 µL/min

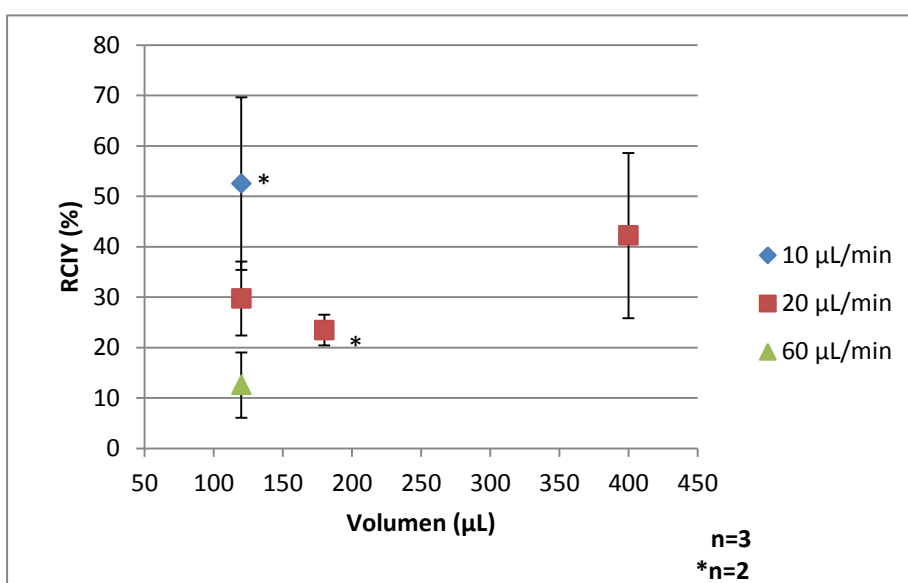


Abb. 2.18: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit vom Volumen bei einer Reaktionstemperatur von 220°C, einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 10, 20 und 60 µL/min

Um den Einfluss der eingesetzten Reaktionsvolumina auf die Ergebnisse wissenschaftlich belegen zu können, wurden drei Versuchsreihen von Experimenten durchgeführt.

Bei der ersten wurde die Synthese bei dem Schritt, wo sich Precursor und [¹⁸F]Fluorid im Reaktor befinden und miteinander reagieren, mit Hilfe des manuellen Modus des NanoTek® LF unterbrochen. Bei einer normalen Synthese im „Discovery mode“ wird die

Funktion der Pumpen zwischen der Reaktionsphase und der Sweep-Phase (Abb. 2.3) für einige Bruchteile einer Sekunde gestoppt. Falls da das verwendete Lösungsmittel DMSO im Reaktor zu kochen beginnt, würde sich eventuell der Precursor zersetzen und dadurch läge die Vermutung nahe, dass bei niedrigeren Volumina geringere Produktausbeuten zustande kommen würden. Das Fassungsvermögen eines Mikroreaktors beträgt 15.6 μL . Bei einem Reaktionsvolumen von 60 μL würden also noch 26% der Reaktionslösung im Reaktor verbleiben, bevor die Sweep-Phase beginnt. Bei kleineren Reaktionsvolumina wie 20 μL oder gar 10 μL verbleiben 78% bzw. 100% im Reaktor. Um dies herauszufinden, wurde die Reaktion in den einzelnen Versuchen für 0, 20, 60 und 90 Sekunden gestoppt. Danach wurde die Synthese wie üblich fortgesetzt. Die Reaktionsparameter, mit denen dieser Versuch durchgeführt wurde, waren: 220°C, 2 mg/mL, 5 μL und 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.19 illustriert.

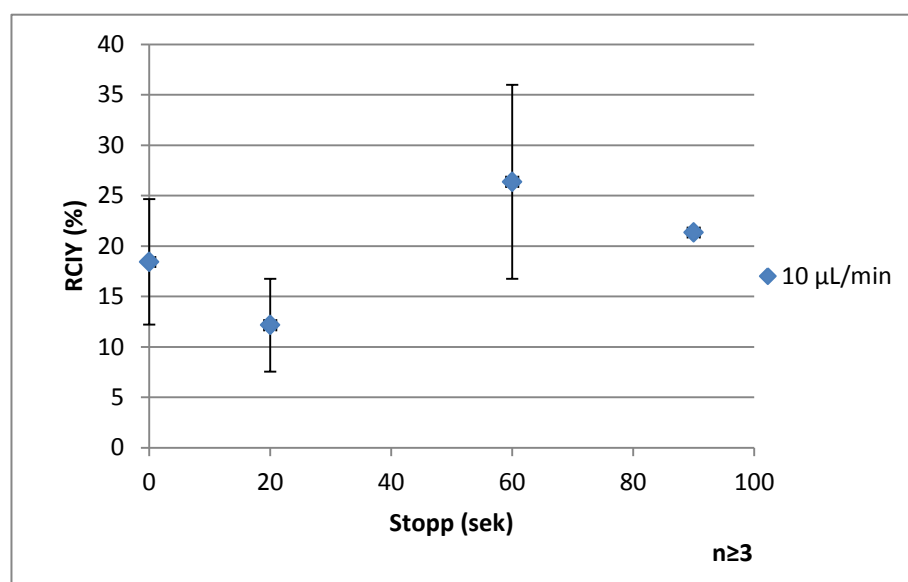


Abb. 2.19: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Verweildauer von Precursor und [^{18}F]Fluorid im Reaktor

Anhand der Ergebnisse kann man deutlich erkennen, dass durch einen Stopp der Synthese im Reaktor eher höhere Umsätze als bei einem normalen Ablauf der Reaktion entstanden sind. Dadurch konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden.

Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe zur Begründung der Volumenabhängigkeit wurden die Produktsammelgefäße mit Hilfe eines Heizblocks auf 60°C vorgeheizt. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt im temperierten Gefäß gesammelt und ausgewertet. Falls die beiden Substanzen durch die Hitze im Gefäß weiterreagieren wür-

den, müssten die beiden getesteten Volumina (5 μL und 30 μL) die gleichen Umsätze liefern.

Die Abbildung 2.20 zeigt die radiochemische Inkorporation bei einer Reaktionstemperatur von 220°C , einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL, einer Durchflussgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einem Volumen von 5 bzw. 30 μL pro Pumpe (entspricht einem Reaktionsvolumen von 10 μL bzw. 60 μL).

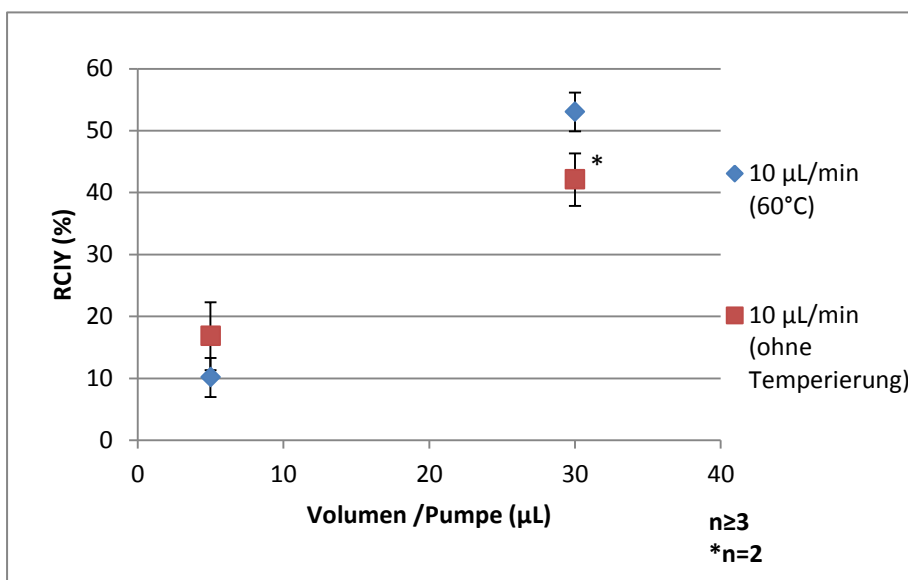


Abb. 2.20: Radiochemische Inkorporation bei einem Volumen von 5 bzw. 30 μL unter Temperierung des Produktsammelgefäßes auf 60°C bzw. ohne Temperierung

Das Diagramm zeigt wiederum volumensabhängige radiochemische Umsätze, sodass die Theorie der Reaktion im geheizten Sammelgefäß nicht bestätigt werden konnte.

Schließlich wurde im Rahmen eines weiteren Versuchs eine Verdünnungsreihe angefertigt. Bei allen Synthesen wurde normalerweise nach jeder Reaktion die Leitung vom Reaktor zum Produktsammelgefäß mit 300 μL DMSO gespült, zusätzlich wurden ca. 0.5 mL HPLC-Laufmittel (Ammoniumacetat-Puffer/AcN: 59/41) im Sammelgefäß vorgelegt. Dadurch ergab sich bei niedrigen Reaktionsvolumina eine wesentlich höhere Verdünnung als bei hohen Volumina. Um herauszufinden, ob das Reaktionsprodukt auch in Pufferlösungen mit hohem Verdünnungsfaktor stabil ist, wurden zwei Synthesen mit je 150 μL Precursor und [^{18}F]Fluorid gemacht und Aliquote davon mit DMSO bzw. HPLC-Laufmittel unterschiedlich verdünnt. Die Verdünnung erfolgte im Duplikat, sodass für beide Synthesen insgesamt vier Ergebnisse pro Verdünnungsstufe ausgewertet werden konnten. Die genauen Verdünnungsschritte kann man in der Tabelle 2.8 nachlesen; die Abbildungen 2.21 und 2.22 stellen alle vier Versuche grafisch dar. Anhand der Ergebnisse kann man deutlich erkennen, dass unterschiedliche Verdünnungsfaktoren keinen Einfluss auf die Produktausbeute von [^{18}F]Altanserin haben, da

sie nur geringfügig voneinander abweichen und kein Zusammenhang zwischen Verdünnung und radiochemischer Inkorporation zu erkennen ist.

| Versuch | Verdünnung | RCIY (%) | Mittelwert | Standardabweichung |
|---------|--------------|----------|------------|--------------------|
| 1a-1 | unverdünnt | 41.4 | 42.8 | 1.7 |
| 1a-2 | unverdünnt | 41.4 | | |
| 2a-1 | unverdünnt | 43.6 | | |
| 2a-2 | unverdünnt | 44.8 | | |
| 1b-1 | mit DMSO 1+1 | 39.9 | 41.4 | 2.9 |
| 1b-2 | mit DMSO 1+1 | 39.6 | | |
| 2b-1 | mit DMSO 1+1 | 40.3 | | |
| 2b-2 | mit DMSO 1+1 | 45.8 | | |
| 1c-1 | mit DMSO 1+2 | 40.8 | 40.2 | 1.1 |
| 1c-2 | mit DMSO 1+2 | 39.2 | | |
| 2c-1 | mit DMSO 1+2 | 39.3 | | |
| 2c-2 | mit DMSO 1+2 | 41.3 | | |
| 1d-1 | mit DMSO 1+4 | 36.4 | 39.8 | 2.5 |
| 1d-2 | mit DMSO 1+4 | 39.5 | | |
| 2d-1 | mit DMSO 1+4 | 42.3 | | |
| 2d-2 | mit DMSO 1+4 | 41 | | |
| 1e-1 | mit DMSO 1+9 | 39 | 41.6 | 2.5 |
| 1e-2 | mit DMSO 1+9 | 39.9 | | |
| 2e-1 | mit DMSO 1+9 | 44 | | |
| 2e-2 | mit DMSO 1+9 | 43.4 | | |
| 1f-1 | mit HPLC 1+1 | 41.4 | 43.5 | 2.1 |
| 1f-2 | mit HPLC 1+1 | 42.2 | | |
| 2f-1 | mit HPLC 1+1 | 46.1 | | |
| 2f-2 | mit HPLC 1+1 | 44.1 | | |
| 1g-1 | mit HPLC 1+2 | 40 | 43.0 | 3.1 |
| 1g-2 | mit HPLC 1+2 | 40.6 | | |
| 2g-1 | mit HPLC 1+2 | 45.6 | | |
| 2g-2 | mit HPLC 1+2 | 45.7 | | |
| 1h-1 | mit HPLC 1+4 | 41.3 | 42.5 | 2.4 |
| 1h-2 | mit HPLC 1+4 | 39.8 | | |
| 2h-1 | mit HPLC 1+4 | 44.2 | | |
| 2h-2 | mit HPLC 1+4 | 44.8 | | |
| 1i-1 | mit HPLC 1+9 | 39.7 | 41.7 | 2.9 |
| 1i-2 | mit HPLC 1+9 | 38.7 | | |
| 2i-1 | mit HPLC 1+9 | 44.4 | | |
| 2i-2 | mit HPLC 1+9 | 44 | | |

Tab. 2.8: Radiochemische Inkorporationen in Abhängigkeit der Verdünnung der Reaktionslösung mit DMSO bzw. HPLC-Laufmittel

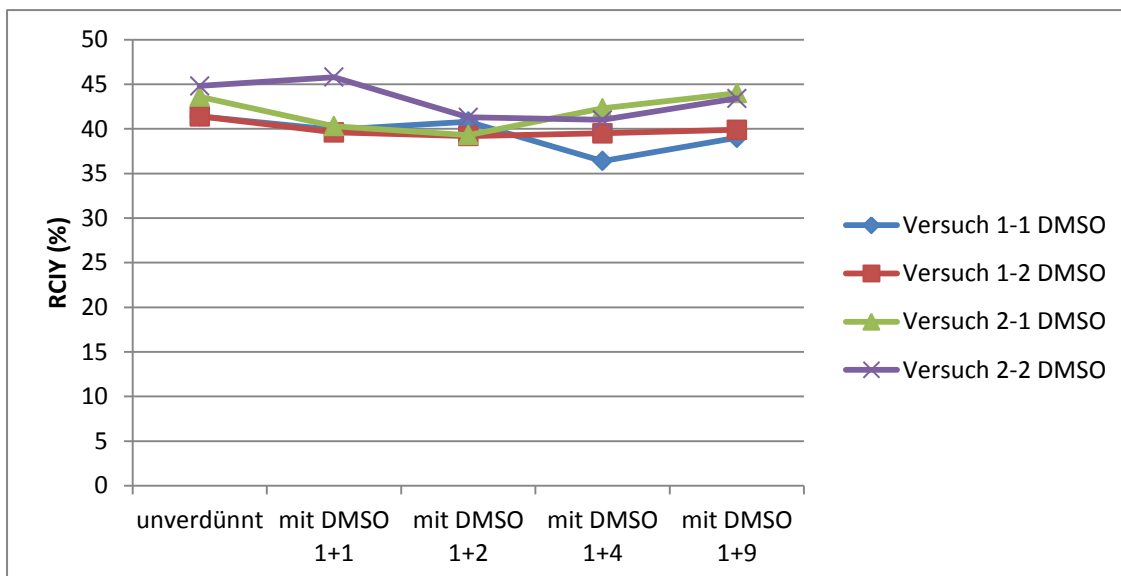


Abb. 2.21: Grafische Darstellung der einzelnen Versuche der Verdünnungsreihe mit DMSO als Lösungsmittel

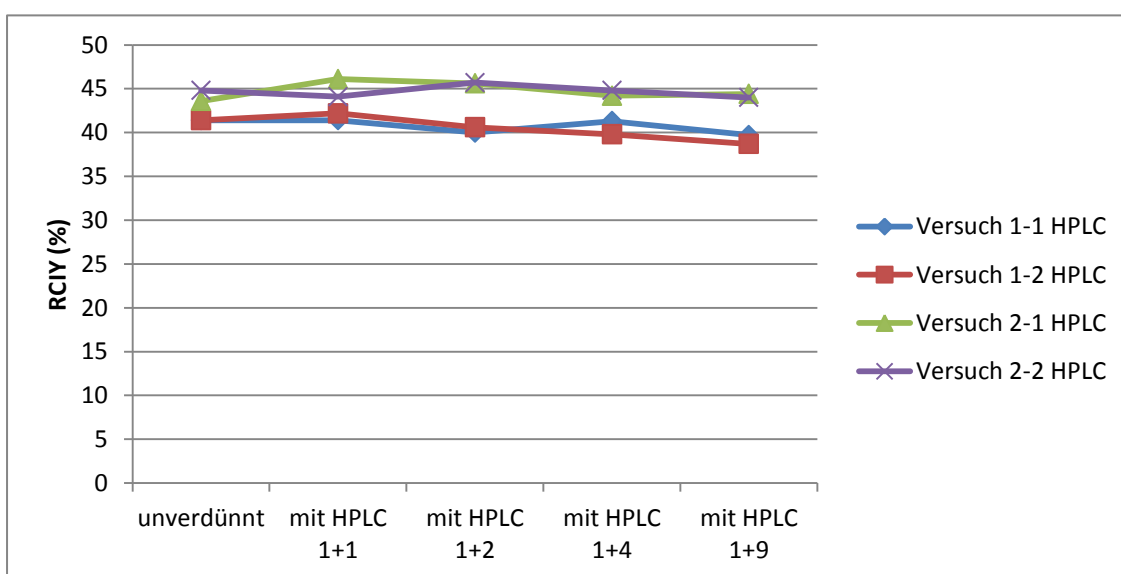


Abb. 2.22: Grafische Darstellung der einzelnen Versuche der Verdünnungsreihe mit HPLC-Laufmittel als Lösungsmittel

Zusammenfassend konnte keine der drei beschriebenen Versuchsreihen belegen, warum durch eine Erhöhung der Reaktionsvolumina der beiden Substanzen auch zugleich die radiochemische Inkorporation steigt, wodurch diese Tatsache nach wie vor unbegründet bleibt.

2.1.3.5 Weitere Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen

2.1.3.5.1 Synthese mit Rückschlagventil

Um herauszufinden, ob der bei der Synthese angewendete Druck das Ausmaß der radiochemischen Inkorporation beeinflusst, wurden im Rahmen einer Versuchsserie einige Reaktionen unter Verwendung eines Rückschlagventils durchgeführt. Dieses wurde an den Reaktor gehängt und diente zur Druckregulation während der Reaktion. Durch Drehen des Ventils konnten unterschiedliche Drücke eingestellt werden. Ohne Rückschlagventil lief eine Synthese mit einem Druck von durchschnittlich 50 psi (3.45 bar) ab. Bei den durchgeführten Versuchen wurden die Reaktionen mit Hilfe des Ventils bei einem Druck von durchschnittlich 200 psi (13.79 bar) ausgeführt.

Die Synthesen wurden bei einer Reaktionstemperatur von 220°C, einer Precursor-Konzentration von 2.5 mg/mL und einem Volumen von 5 bzw. 10 µL durchgeführt. Die Abbildung 2.23 zeigt einen Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Druckregulator.

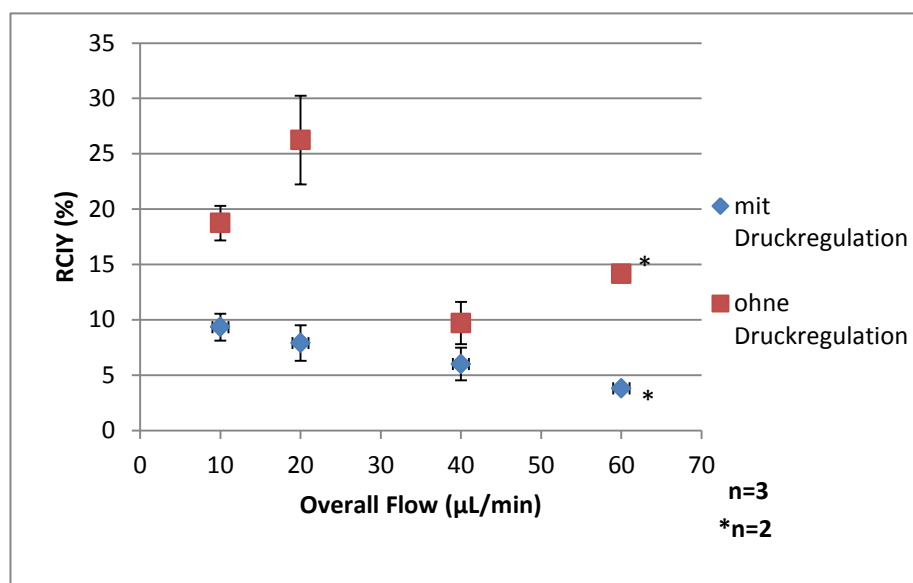


Abb. 2.23: Vergleich der radiochemischen Inkorporationen mit bzw. ohne Druckregulation bei unterschiedlichen Durchflussgeschwindigkeiten

Man kann deutlich erkennen, dass durch die Anwendung des Rückschlagventils bei allen getesteten Durchflussgeschwindigkeiten geringere radiochemische Inkorporationen erzielt wurden als ohne Rückschlagventil. Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, dass eine Druckregulation keine Verbesserung der Syntheseausbeuten mit sich bringt.

2.1.3.5.2 Synthese mit Dimethylformamid (DMF)

DMF ist ein polares organisches Lösungsmittel, welches ähnliche Eigenschaften wie das für die Synthesen verwendete Lösungsmittel DMSO besitzt, aber geringfügig giftiger als DMSO ist. Um zu sehen, ob DMF eventuell bessere Reaktions-eigenschaften als DMSO aufweist, wurde im Rahmen eines Versuchs eine Synthese mit DMF anstelle von DMSO durchgeführt.

Bereits während der Synthese konnte ein Druckanstieg im Reaktor beobachtet werden. Wenige Minuten später wurde die Reaktion durch das NanoTek® LF-Modul abgebrochen, da es zu einem Überdruck (≥ 400 psi) kam, was auf eine Verstopfung der Kapillare im Reaktor zurückzuführen war. Der Reaktor wurde gewechselt, aber auch mit dem neuen Reaktor kam es nach einigen Minuten erneut zu einem Überdruck. Nach einem neuerlichen Reaktorwechsel wurde die Reaktionstemperatur auf 200°C (statt 220°C) gesenkt, um den Druck möglichst niedrig zu halten. Trotz allem kam es auch hier gegen Schluss der Reaktion zur Verlegung der Kapillare im Reaktor. Möglicherweise führte das Lösungsmittel DMF zur Entstehung von Nebenprodukten, die im Reaktor auskristallisierten und somit die Kapillare verschlossen. Die Qualitätskontrolle des Syntheseprodukts mittels Radio-DC zeigte vier verschiedene Peaks (Abb. 2.24). Einer davon konnte als $[^{18}\text{F}]$ Fluorid-Peak identifiziert werden, bei den drei restlichen Peaks war eine 100%ige Identifizierung nicht möglich, da die Bestimmung des R_f -Wertes nicht vorgenommen wurde. Vermutlich handelt es sich bei einem der Peaks um $[^{18}\text{F}]$ Altanserin, die anderen beiden weisen auf entstandene Nebenprodukte hin. Trotz dieser Unklarheiten kann man eindeutig erkennen, dass die radiochemische Inkorporation an $[^{18}\text{F}]$ Altanserin unter Verwendung von DMF deutlich geringer war als unter Verwendung von DMSO.

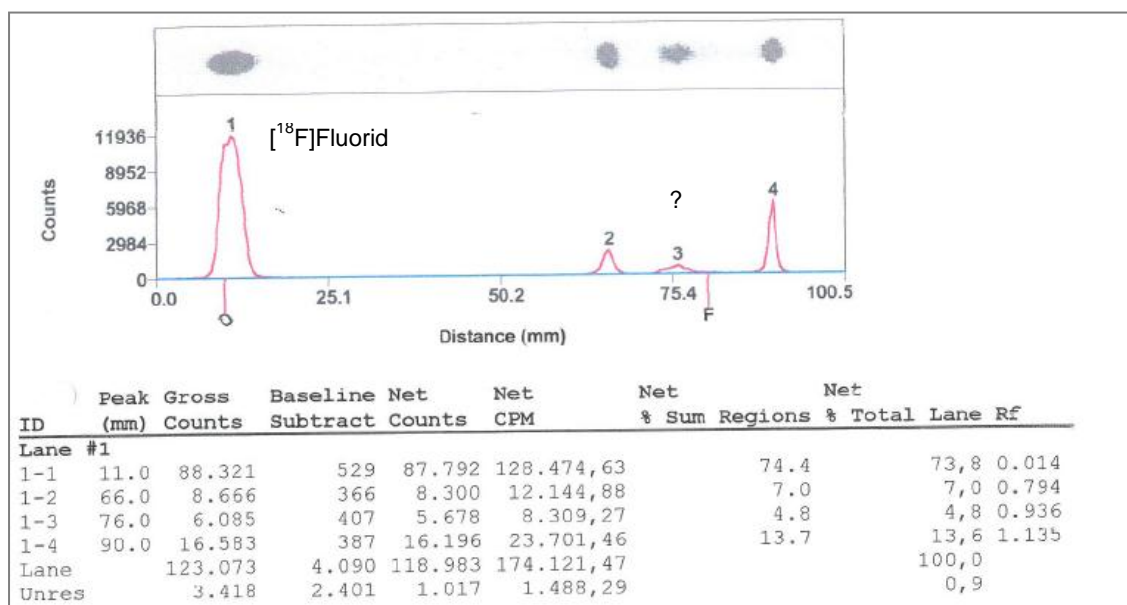


Abb. 2.24: DC-Chromatogramm einer Synthese mit DMF als Lösungsmittel

Aufgrund der bei der Synthese mit DMF aufgetretenen Druckprobleme sowie der unzureichenden radiochemischen Inkorporation ist von einer Verwendung von DMF als Lösungsmittel bei der Synthese von [^{18}F]Altanserin abzuraten.

2.1.4 Diskussion

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen für die Synthese von [^{18}F]Altanserin mit Hilfe des Mikrofluidsystems NanoTek[®] LF wurden eine Vielzahl von Synthesen unter Variation der Reaktionsparameter Precursor-Konzentration, Reaktionstemperatur, Durchflussgeschwindigkeit und Volumen durchgeführt.

Unter allen getesteten Precursor-Konzentrationen konnte jene mit 2 mg/mL als Beste ermittelt werden. Ähnlich gute Ergebnisse wurden mit einer Konzentration von 2.5 mg/mL erzielt, alle anderen Konzentrationen lieferten deutlich geringere Umsätze. Entgegen der Erwartungen konnte mit einer Steigerung der Precursor-Konzentration keine Erhöhung des Umsatzes erreicht werden.

Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Reaktionstemperatur wurden bei 220°C erzielt, 200°C und 180°C zeigten zumeist weniger gute radiochemische Inkorporationen. In sehr wenigen Reaktionsserien konnten bei 200°C bessere Produktumsätze als bei 220°C erreicht werden, allerdings lässt sich diesbezüglich kein Zusammenhang hinsichtlich Precursor-Konzentration oder Durchflussgeschwindigkeit erkennen. Bei Raumtemperatur wurden mit einer radiochemischen Inkorporation von $0.1 \pm 0.14\%$ (Reaktionsbedingungen: Precursor-Konzentration 2.5 mg/mL, Durchflussgeschwindigkeit 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, Volumen 10 μL) keine brauchbaren Ergebnisse erzielt.

Unter den getesteten Durchflussgeschwindigkeiten konnten mit 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ Durchflussgeschwindigkeit (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ je Pumpe) in den meisten Fällen die besten radiochemischen Inkorporationsraten erreicht werden. Ebenfalls gute, manchmal sogar bessere Ergebnisse wurden mit 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ erzielt. Bei den höheren Geschwindigkeiten 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ und 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurden geringere Umsätze verzeichnet.

Unerwarteterweise spielten auch die Reaktionsvolumina von Precursor und [^{18}F]Fluorid bei der Synthese eine wichtige Rolle, sodass mit steigenden Volumina auch eine Erhöhung des Umsatzes an [^{18}F]Altanserin beobachtet werden konnte.

Die höchste radiochemische Inkorporation von $42.2 \pm 16.4\%$ wurde demnach bei einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL, einer Reaktionstemperatur von 220°C, einer

Durchflussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einem Volumen von je 400 μL pro Pumpe erzielt.

Anhand der großen Standardabweichung kann man bereits erkennen, dass die Ergebnisse stark variierten. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass das Ausmaß des Umsatzes an $[^{18}\text{F}]\text{Altanserin}$ tagesabhängig war (siehe Abb. 2.12). Die Ergebnisse innerhalb eines Tages bei gleichen Bedingungen waren meist sehr gut reproduzierbar, führte man dieselbe Synthese an einem anderen Tag durch, kam es zu Abweichungen von bis zu 20% vom bisherigen Ergebnis, was man auf eine ungleiche Güte der azeotropen Trocknung sowie leichten Konzentrationsschwankungen der Precursor-Lösung zurückführen kann, da diese täglich neu hergestellt wurde.

Die Abbildungen 2.25 und 2.26 zeigen Syntheseveruche, die unter exakt gleichen Reaktionsbedingungen an zwei unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden. Es lassen sich große Unterschiede bezüglich der radiochemischen Inkorporationen an beiden Tagen erkennen ($39.1 \pm 5.1\%$ bei 220°C , 2 mg/mL am 20.04.2011 vs. $14.9 \pm 3.7\%$ bei 220°C , 2 mg/mL am 16.05.2011). Zugleich ist die abfallende Produktentstehung mit zunehmender Precursor-Konzentration in den beiden Graphiken sehr gut dargestellt. Auch wenn die Syntheserien unterschiedliche Ergebnisse lieferten, so ist jedoch der Trend gleichbleibend. In beiden Fällen wurden die besten Ergebnisse bei 2 mg/mL in Reaktionslösung und 220°C erreicht.

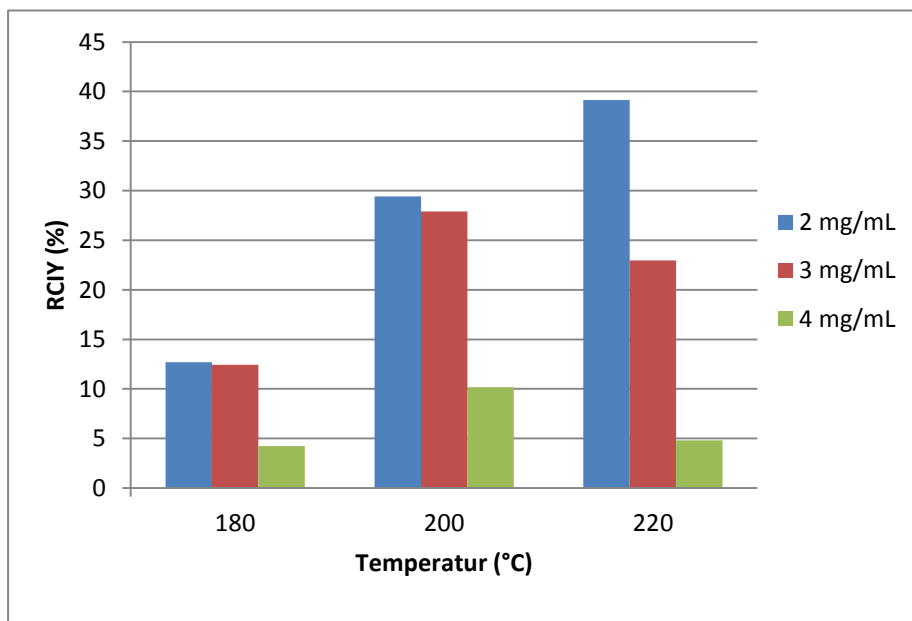


Abb. 2.25: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Temperatur bei unterschiedlichen Precursor-Konzentrationen (2, 3 und 4 mg/mL); Versuche durchgeführt am 20.04.2011

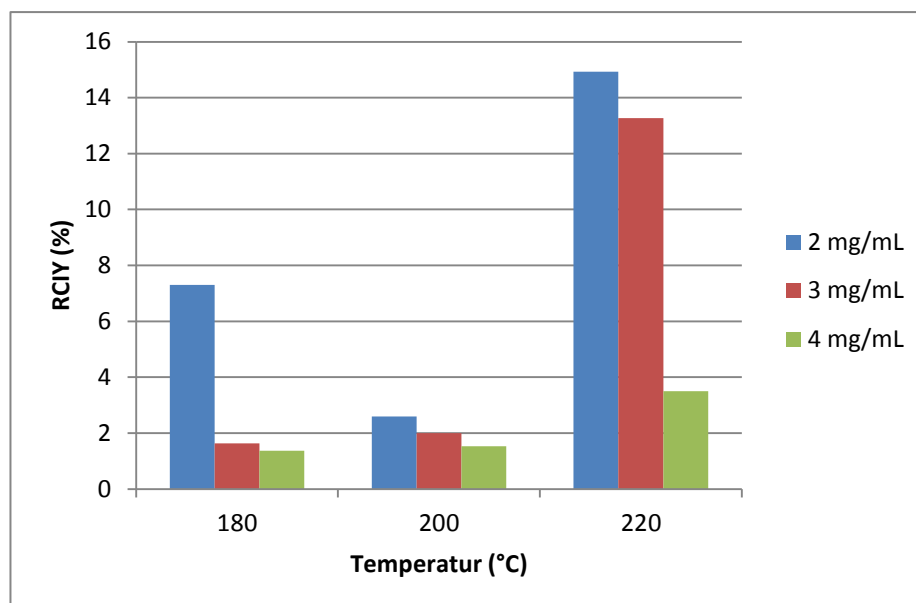


Abb. 2.26: Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Temperatur bei unterschiedlichen Precursor-Konzentrationen (2, 3 und 4 mg/mL); Versuche durchgeführt am 16.05.2011

Desweiteren konnten während der Radiosynthese Aktivitätsverluste beobachtet werden, sodass lediglich $65.9 \pm 6.1\%$ der ursprünglichen Aktivität nach der azeotropen Trocknung und der Synthese wiedergefunden werden konnten (Tab. 2.9). Die größten Mengen an Radioaktivität ($34.1 \pm 11.7\%$) blieben im Concentrator-Vial zurück, bedingt durch die Adsorption von $[^{18}\text{F}]$ Fluorid an der Glasoberfläche, sowie durch unvollständiges Aufziehen der Lösung in die Loop. Knapp 30% der Ausgangsaktivität wurde von $[^{18}\text{F}]$ Altanserin eingenommen.

| | Radioaktivität \pm Standardabweichung (%) |
|---|--|
| $[^{18}\text{F}]$Altanserin | 28.5 ± 7.5 |
| Concentrator Vial | 34.1 ± 11.7 |
| SepPak | 0.2 ± 0.2 |
| Targetwasser Vial | 3.1 ± 1.4 |
| Wiederfindung | 65.9 ± 6.1 |

Tab. 2.9: Verbliebende Radioaktivität nach der Synthese von $[^{18}\text{F}]$ Altanserin

Die Radiosynthese von [^{18}F]Altanserin mit Hilfe des Advion NanoTek[®] LF konnte im Allgemeinen fast immer problemlos durchgeführt werden. Durch Verunreinigungen von Lösungsmittel, aber auch durch Auskristallisation von potentiellen Nebenprodukten kam es hin und wieder zu einer Verstopfung der Kapillare im Reaktor, wodurch ein Überdruck erzeugt wurde. Um Schädigungen der Pumpen zu verhindern, wurden alle laufenden Aktionen ab einem Druck von ≥ 400 psi (27.6 bar) automatisch durch das System gestoppt. Durch neuerliches Aufheizen und Reinigung des Reaktors mit Lösungsmittel konnte man die verlegte Kapillare wieder durchgängig machen. Meistens war es aber auch nach mehreren Reinigungsschritten nicht möglich, die Verstopfung zu lösen, sodass der Reaktor zur Durchführung einer neuen Synthese ausgetauscht werden musste.

2.2 Produktisolierung, Aufreinigung und Formulierung von [^{18}F]Altanserin

Nach Ermittlung der besten Reaktionsbedingungen für die Synthese von [^{18}F]Altanserin war es notwendig, das Produkt mittels präparativer HPLC zu isolieren und anschließend zu formulieren, um die Applikation an einem Patienten zu ermöglichen.

Für einen guten HPLC-Assay ist es wichtig, dass das Syntheseprodukt nach möglichst kurzer Zeit von der präparativen Säule eluiert wird und dass die Durchflussgeschwindigkeit so niedrig wie möglich gehalten wird, um einen hohen Laufmittelverbrauch zu vermeiden.

In der Publikation von Massarweh et al. (2009) [84] werden vier verschiedene präparative HPLC-Assays miteinander verglichen.

Lemaire et al. (1991) [78] beschreiben eine HPLC-Methode, bei der das Produkt bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 16 mL/min nach 55 min eluiert wird. Bei Tan et al. (1999) [79] beträgt die Retentionszeit von [^{18}F]Altanserin ebenfalls 55-60 min, allerdings wird hier die Auftrennung von Produkt und Precursor mit einer wesentlich niedrigeren Durchflussgeschwindigkeit (5 mL/min) durchgeführt. Hamacher und Coenen (2006) [81] gelingt im Rahmen ihrer Forschungsarbeit eine Reduktion der Retentionszeit auf 23 min. Von großem Nachteil ist hier jedoch die hohe Durchflussgeschwindigkeit von 20 mL/min. Beim HPLC-Assay von Hasler et al. (2009) [85] beträgt die Durchflussgeschwindigkeit 9 mL/min; [^{18}F]Altanserin wird nach 50 min von der Säule eluiert.

Die für die Versuche verwendeten Säulen und Laufmittel der einzelnen Arbeitsgruppen sind in Tabelle 2.10 beschrieben.

| Methode | HPLC-Laufmittel | HPLC-Säule |
|------------------|---|-----------------------------------|
| Lemaire et al. | MeOH/THF/H ₂ O pH 5: 12.5/32.4/55 | Lichrosorb RP Select-B |
| Tan et al. | THF/NaOAc 80mM pH 5: 32.5/67.5 | Lichrospher RP Select-B |
| Hamacher et al. | AcN/0.1% TEA pH 6.8: 45/55 | Prontosil 120-5-C18- ace-EPS |
| Hasler et al. | NaOAc 0.08M pH 5/EtOH/THF: 87.7/4.1/8.2 | Nucleosil 100-7 C18 |
| Massarweh et al. | MeOH/THF/NaOAc 0.05N pH 5: 27/18/55 | Symmetry prep-7µm C18 (Waters) |

Tab. 2.10: Vergleich der verwendeten HPLC-Laufmittel und –säulen der angeführten Arbeitsgruppen [84]

Alle vier Methoden sind dadurch charakterisiert, dass sie entweder eine lange Retentionszeit oder eine hohe Durchflussgeschwindigkeit oder sogar beides aufweisen, was für die Gesamtsynthesedauer sowie für den Verbrauch an Lösungsmittel von großem Nachteil ist. Massarweh et al. [84] beschreiben in ihrer Arbeit einen HPLC-Assay, in dem sowohl die Durchflussgeschwindigkeit als auch die Retentionszeit des Produkts niedrig gehalten wird. Unter Verwendung der HPLC-Säule Symmetry Prep-7µm C18 und des Laufmittels MeOH/THF/ NaOAc 0.05N pH 5: 27/18/55 wird [¹⁸F]Altanserin mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 mL/min nach 10 min von der Säule eluiert.

Aufgrund dieser guten Parameter war es naheliegend, dass Massarweh's HPLC-Methode als Trennassay für [¹⁸F]Altanserin und Precursor verwendet werden sollte. Da die dort verwendete HPLC-Säule in meiner Arbeitsgruppe jedoch nicht verfügbar war und eine Beschaffung mehrere Wochen gedauert hätte, wurde mit Hilfe von anderen Säulen mit ähnlichen Trenneigenschaften versucht, die Bedingungen nachzustellen.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Isolierung und Formulierung von [¹⁸F]Altanserin inklusive Qualitätskontrolle sowie die Methoden zur Entwicklung eines geeigneten HPLC-Assays unter Variation von HPLC-Säule und Laufmittel detailliert beschrieben.

2.2.1 Materialien

Im folgenden Abschnitt sind die für die Isolierung, Formulierung und Qualitätskontrolle notwendigen Chemikalien, Lösungen, Gase und Gerätschaften aufgelistet.

2.2.1.1 Materialien für die präparative HPLC

2.2.1.1.1 Chemikalien, Lösungen und Gase

- Acetonitril (AcN): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
CAS: 75-05-8
- Tetrahydrofuran (THF): Fluka Chemika, Schweiz. CAS: 109-99-9
- Methanol (MeOH): LiChrosolv[®] Reag. PhEur., Merck KGaA, Deutschland. CAS: 67-56-1
- Natriumacetat Trihydrat: (NaOAc) Fluka BioChemika, Deutschland. CAS: 6131-90-4
- Salzsäure (HCl, 1N): Merck KGaA, Deutschland. CAS: 7647-01-0
- Aqua purificata: Anstaltsapotheke, AKH Wien, Österreich
- Triethylamin (TEA): Sigma-Aldrich, Deutschland. CAS: 121-44-8
- Ammoniumacetat: Merck KGaA, Deutschland. CAS: 631-61-8
- Essigsäure: 100%, reinst, Riedel-de Haen Seelze, Deutschland
CAS: 64-19-7
- Helium: Messer Gas, Österreich

2.2.1.1.2 Gerätschaften

- GETracerlab F_XF_N: GE Healthcare, Schweden
Pumpe: Sykam, UV- Detektor (254 nm) & Radio-
detektor, Software: Version 2.0.5
- Präp. HPLC-Säule: Chromolith[®] SemiPrep RP-18e, 100-10 mm
Merck KGaA, Deutschland
- Präp. HPLC-Säule: ProntoSIL 120 C18 ace-EPS 250x20 mm 5 µm
VDS optilab Chromatographie Technik GmbH,
Deutschland
- Präp. HPLC-Säule: Gemini 10µ C18 110A 250x10 mm 10 micron
Fa: Phenomenex

2.2.1.2 Materialien für die Formulierung

2.2.1.2.1 Chemikalien und Lösungen

- Aqua purificata: Anstaltsapotheker, AKH Wien, Österreich
- Ethanol (EtOH): absolut reinst, Merck KGaA, Deutschland
CAS: 64-17-5
- Natriumchlorid (NaCl) 0.9%: B.Braun, 9 mg/mL Injektionslösung zur i.v. od. s.c. Anwendung (10 mL)
- Natriumchlorid (NaCl) 3%: Mayrhofer Pharmazeutika GmbH & Co KG, Österreich
- Phosphatpuffer (125 mmol): zur Verfügung gestellt von AKH Wien

2.2.1.2.2 Gerätschaften

- C₁₈-SepPak: Sep-Pak[®] Plus C-18, Waters Corporation, USA

2.2.1.3 Materialien für die Qualitätskontrolle

2.2.1.3.1 Chemikalien und Lösungen

- Ammoniumacetat: Merck KGaA, Deutschland. CAS: 631-61-8
- Aqua purificata: Anstaltsapotheker, AKH Wien, Österreich
- Salzsäure (HCl, 1N): Merck KGaA, Deutschland. CAS: 7647-01-0
- Acetonitril (AcN): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
CAS: 75-05-8

2.2.1.3.2 Gerätschaften

- Analyt. HPLC-Pumpe: LaChrom Pump L-7100, Merck-Hitachi
Software: GINA Star Station
Radiodetektor: NaI-Kristall, Iteco, Italien
UV-Detektor: Wellenlänge 254 nm
- Analyt. HPLC-Säule: Gemini 3μ C-18 110A, 150 x 4.60 mm,
3 micron, Fa: Phenomenex
- Dosiskalibrator: Veenstra Instruments VDC-404
- DC-Platten: TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck KGaA, Deutschland
- Autoradiograph: Instantimager, Packard Instrument Company, USA

2.2.2 Methoden

Im nachfolgenden Abschnitt wird zunächst die Isolierung und Formulierung von [¹⁸F]Altanserin aus dem Reaktionsgemisch sowie die Qualitätskontrolle beschrieben.

Danach werden die einzelnen Methoden zur Entwicklung eines geeigneten HPLC-Assays unter Variation von Säule und Laufmittel detailliert dargelegt.

2.2.2.1 Isolierung von [^{18}F]Altanserin mittels präparativer HPLC

Die Produktisolierung wurde mit dem Synthesemodul GETracerlab $\text{F}_\text{X}\text{F}_\text{N}$ durchgeführt, welches ein semipräparatives HPLC-System inklusive Pumpe, einen UV-Detektor und einen Radiodetektor beinhaltet. Dieses Modul wurde, ebenso wie das NanoTek[®] LF-Modul, über eine Software am Laptop gesteuert. Durch Programmierung eines Makros war es möglich, die notwendigen Schritte bis zur Isolierung des Produkts automatisch ablaufen zu lassen. Einzig das Schneiden des [^{18}F]Altanserin-Peaks musste manuell durchgeführt werden.

Die Reaktionslösung, die nach der Synthese von [^{18}F]Altanserin mittels NanoTek[®] LF gewonnen wurde, setzte sich zusammen aus: [^{18}F]Altanserin, Nitroaltanserin und [^{18}F]Fluorid in DMSO. Mittels präparativer HPLC sollten die einzelnen Komponenten voneinander getrennt werden; das Produkt isoliert und in einem darauffolgenden Schritt formuliert werden. In Abbildung 2.27 ist das Set-up des GETracerlab $\text{F}_\text{X}\text{F}_\text{N}$ zur Isolierung und Aufreinigung des Produkts schematisch dargestellt.

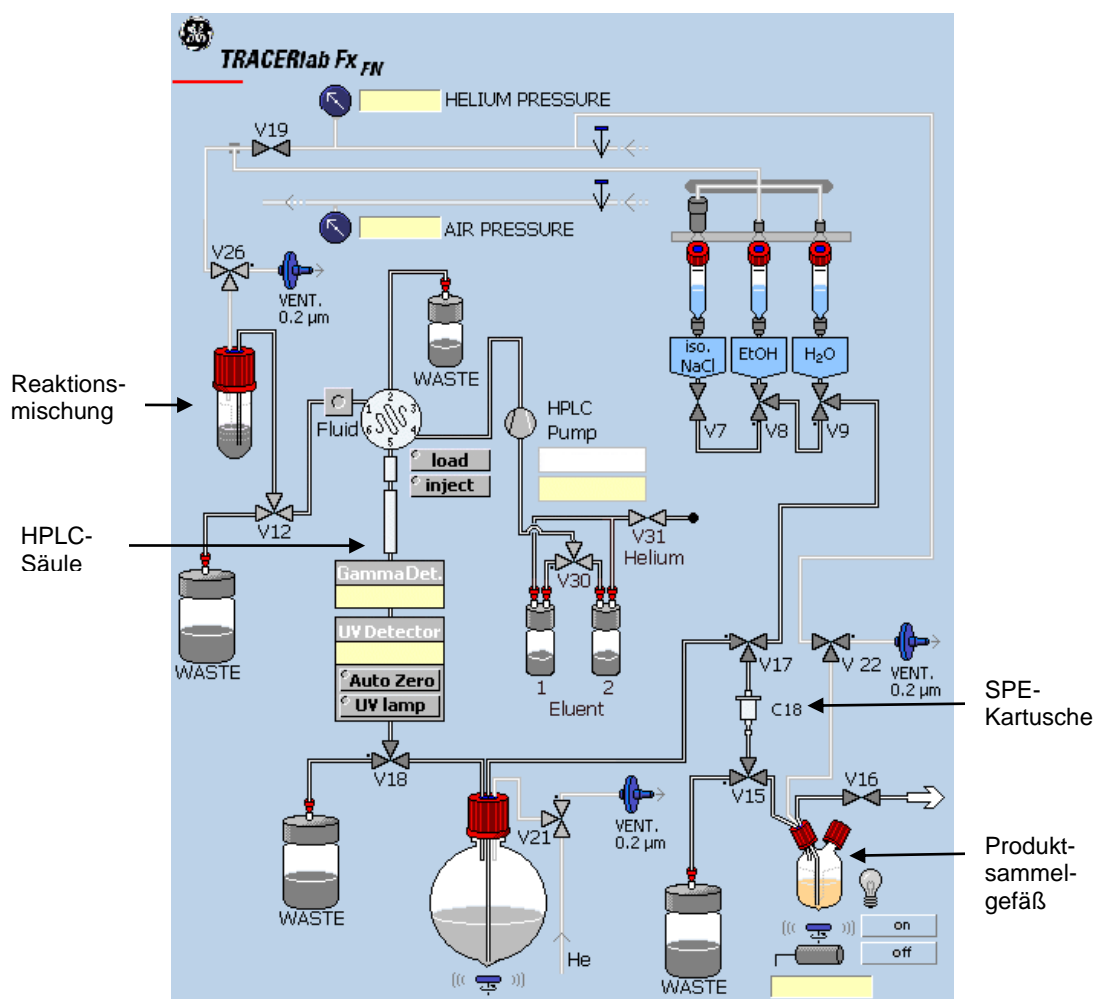


Abb. 2.27: Schematische Darstellung des Set-ups des GETracerlab $\text{F}_\text{X}\text{F}_\text{N}$

Die Reaktionslösung, die sich in einem mit Septum luftdicht verschlossenem Wheaton-Vial befand, wurde über eine Leitung an das Gerät angeschlossen. Über eine Gasleitung (V26) wurde das Reaktionsgemisch unter Anwendung von Druckluft und Helium aus dem Gefäß über eine Leitung (V12) zum Fluiddetektor befördert. Nachdem die gesamte Flüssigkeit beim Detektor angelangt war, erfolgte der Befehl für die Injektion in die Loop. Von der Loop gelangte die Reaktionslösung auf die präparative HPLC-Säule. Mittels UV- und Radiodetektor konnte man die Auftrennung der einzelnen Komponenten verfolgen. Nitroaltanserin erschien im UV-Kanal, [^{18}F]Fluorid und [^{18}F]Altanserin wurden im Radioaktivitätskanal registriert. Über die Schnittstelle V18 konnte das Eluat in den „Waste“ oder in ein Sammelgefäß (in der Abbildung durch einen runden Kolben dargestellt) geleitet werden. Um einen Peak herauszuschneiden, wurde das Ventil V18 mittels Mausklick so gelegt, dass die Flüssigkeit in das Sammelgefäß gebracht wurde. Um alle Komponenten im Reaktionsgemisch den einzelnen Peaks zuordnen zu können, wurden zunächst alle Peaks geschnitten und deren Identität mittels Qualitätskontrolle (DC, HPLC) überprüft. Nach der Identifizierung von [^{18}F]Altanserin und Ermittlung von dessen Retentionszeit war es ausreichend, ausschließlich den [^{18}F]Altanserin-Peak zu schneiden und alle anderen Peaks in den „Waste“ zu leiten.

Für die Produktisolierung wurden drei unterschiedliche präparative HPLC-Säulen und verschiedene Laufmittel getestet. Zuerst wurden Versuche mit der Säule Chromolith SemiPrep RP-18e und dem Laufmittel NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2 durchgeführt. Anschließend wurde die Säule ProntoSIL 120 C18 mit dem Laufmittel AcN/0.1% TEA pH 6.8: 45/55 verwendet. Die dritte getestete Säule (Gemini C18) entspricht der verwendeten analytischen HPLC-Säule. Mit dieser wurden Versuche mit zwei verschiedenen Laufmitteln (NH_4OAc 24 mmol pH 5.4/AcN: 65/35 und NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2) durchgeführt (siehe Tab. 2.12). Die detaillierte Beschreibung der Versuche sowie die Ergebnisse sind in Kapitel 2.2.3 erläutert.

2.2.2.2 Formulierung von [^{18}F]Altanserin

Die Formulierung von [^{18}F]Altanserin wurde händisch vorgenommen. Dabei wurde die [^{18}F]Altanserin-Fraktion in einem Rundkolben mit 100 mL Wasser verdünnt und über eine mit 5 mL Ethanol und 10 mL Wasser konditionierte C_{18} -SepPak gedrückt. Danach wurde die Säule mit 10 mL Wasser gewaschen, um Laufmittelreste entfernen. Mit 1.5 mL Ethanol wurde [^{18}F]Altanserin schließlich von der Säule eluiert und 5 mL

0.9% NaCl wurden hinzugefügt. Um die Osmolalität und den pH-Wert richtig einzustellen, wurden zusätzlich 6 mL 0.9% NaCl, 1 mL 3% NaCl und 1 mL Phosphatpuffer 125 mmol zugegeben.

Die Aufreinigung kann jedoch auch mit dem GETracerlab $F_X F_N$ automatisch durchgeführt werden (Abb. 2.27). Dafür wird das isolierte Produkt aus dem Kolben durch Einleitung eines Helium-Stroms (V21) über das Ventil V17 auf eine C_{18} -Säule gebracht. Danach werden der Reihe nach Wasser, Ethanol und 0.9% NaCl in entsprechender Menge über V9, V8 und V7 über die Säule gedrückt und das aufgereinigte Produkt wird über V15 in das Produktsammelgefäß geleitet. Auf diese Weise wurde die Formulierung von $[^{18}F]$ Altanserin zwar nie durchgeführt, allerdings ist dies eine bewährte Methode, die auch für Aufreinigungen anderer $[^{18}F]$ Radiotracer verwendet wird und immer einwandfrei funktioniert.

2.2.2.3 Qualitätskontrolle der geschnittenen und formulierten $[^{18}F]$ Altanserin-Peaks

Die Qualitätskontrolle wurde, wie bereits in Kapitel 2.1.2.6 beschrieben, mittels Radio-DC und Radio-HPLC durchgeführt. Beispielhafte Chromatogramme sind in den Abbildungen 2.28, 2.29, 2.30 und 2.31 dargestellt.

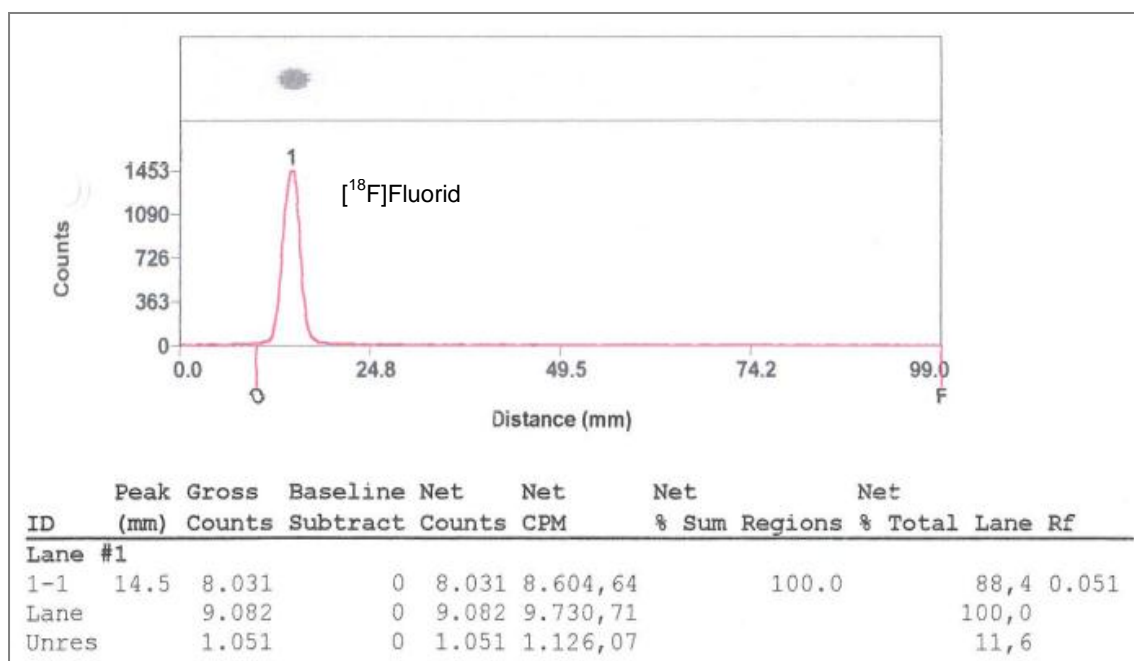


Abb. 2.28: DC- Chromatogramm des geschnittenen $[^{18}F]$ Fluorid-Peaks (präp. HPLC-Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2, Flow: 5 mL/min)

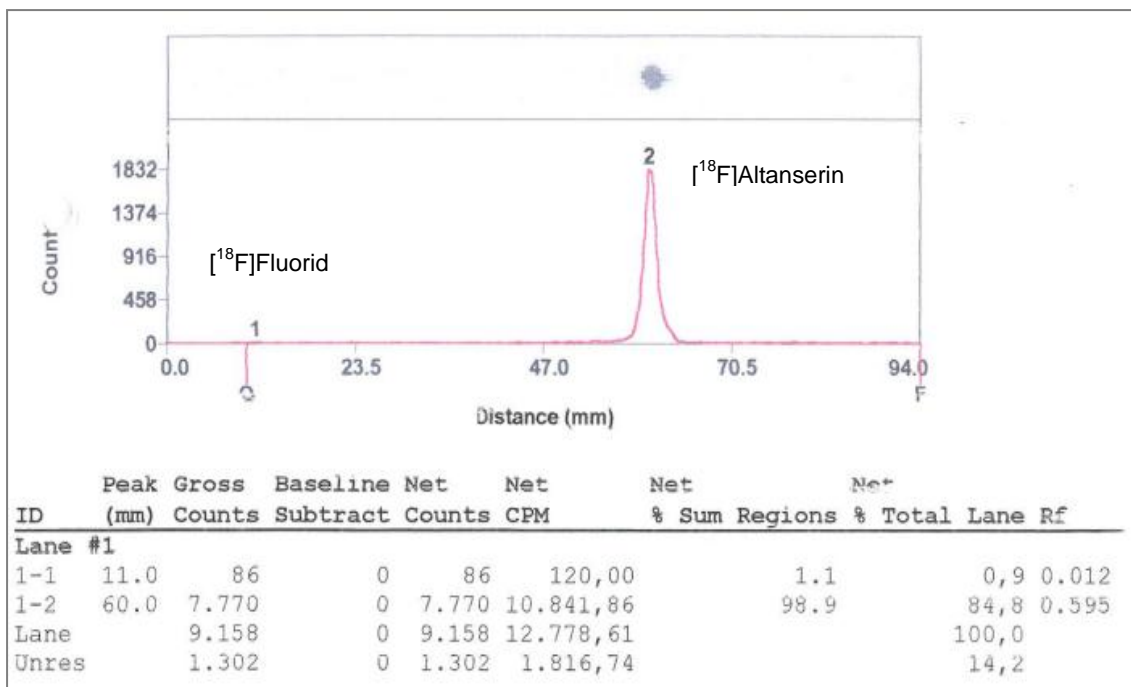


Abb. 2.29: DC-Chromatogramm des formulierten [^{18}F]Altanserin-Peaks (präp. HPLC-Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2, Flow: 5 mL/min)

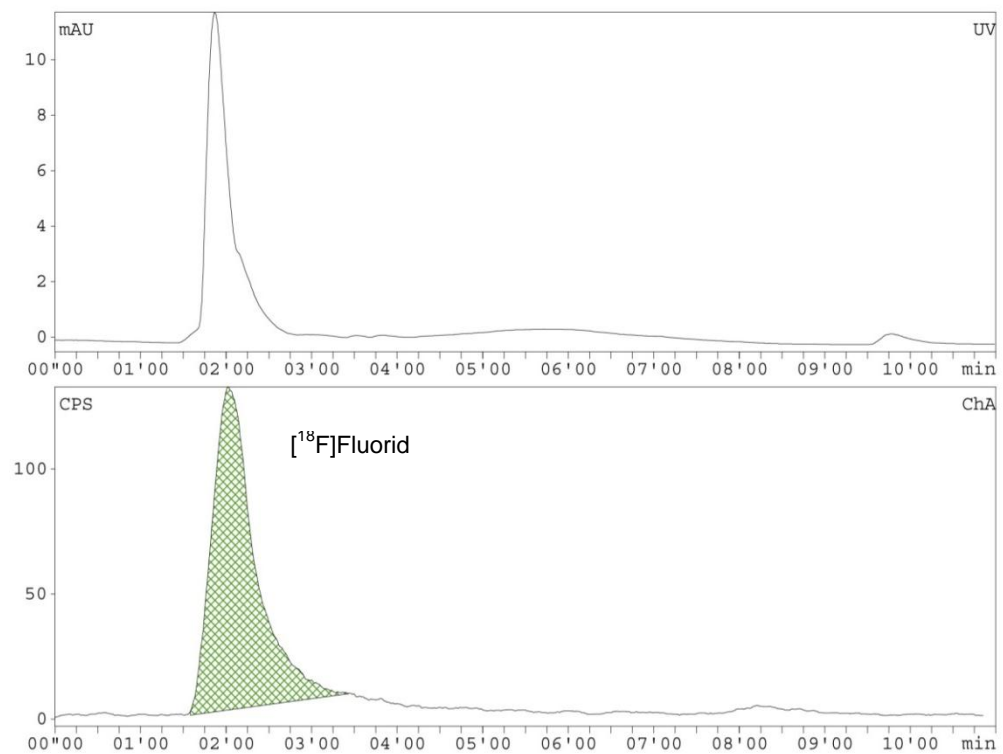


Abb. 2.30: HPLC-Chromatogramm des geschnittenen [^{18}F]Fluorid-Peaks (präp. HPLC-Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2, Flow: 5 mL/min)

Im HPLC-Chromatogramm sind abermals Peaks von [^{18}F]Fluorid ($t_R = 2.08 \text{ min}$) und Nitroaltanserin ($t_R = 8.49 \text{ min}$) zu sehen. Weiters kann man im UV-Kanal einen „kalten“ Altanserin-Peak bei $t_R = 7.26 \text{ min}$ erkennen. (Abb. 2.31)

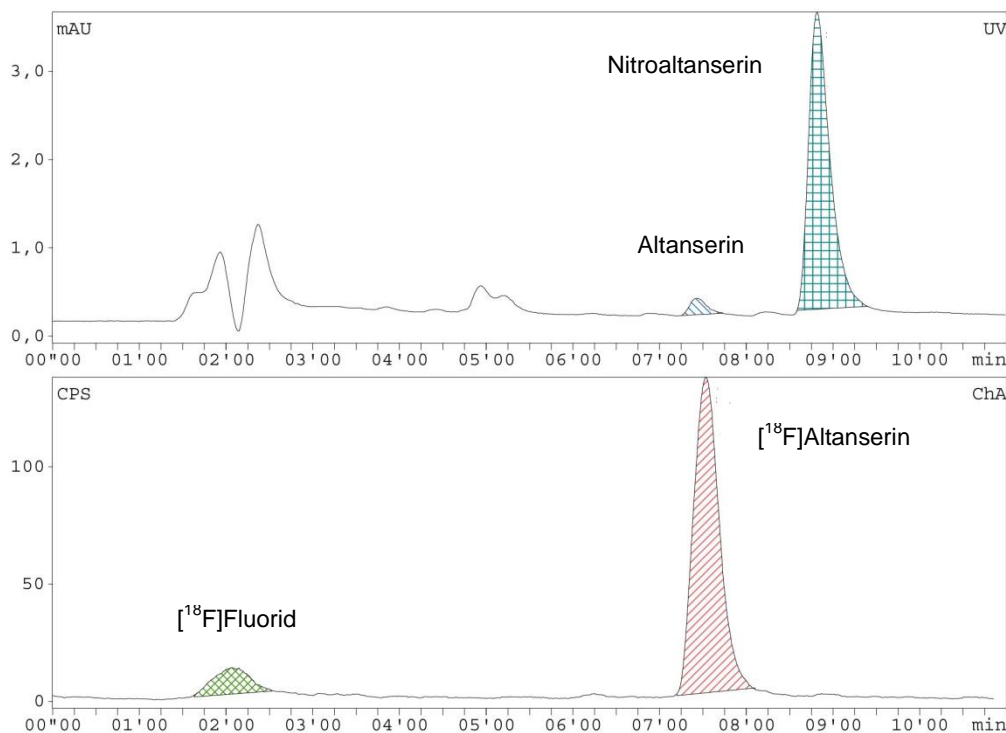


Abb. 2.31: HPLC-Chromatogramm des formulierten [^{18}F]Altanserin-Peaks (präp. HPLC-Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH:73/10.8/16.2, Flow: 5 mL/min)

Im Zuge der Qualitätskontrolle soll dann auch die spezifische Aktivität des Tracers ermittelt werden. Zur Bestimmung der „kalten“ Menge des Reaktionsprodukts dient das UV-Detektorsignal der analytischen HPLC. Zu diesem Zwecke wurde eine Standardreihe (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$) des Altanserinstandards im Triplikat analysiert und das Messsignal gegen die Konzentration aufgetragen. (Abb. 2.32)

Mit Hilfe einer Regressionsgeraden, die durch alle gemessenen Punkte gelegt wird, konnte die Empfindlichkeit der Methode bestimmt werden. Der Korrelationskoeffizient (R^2) gibt den linearen Zusammenhang zwischen den Konzentrationswerten und den Messwerten an.

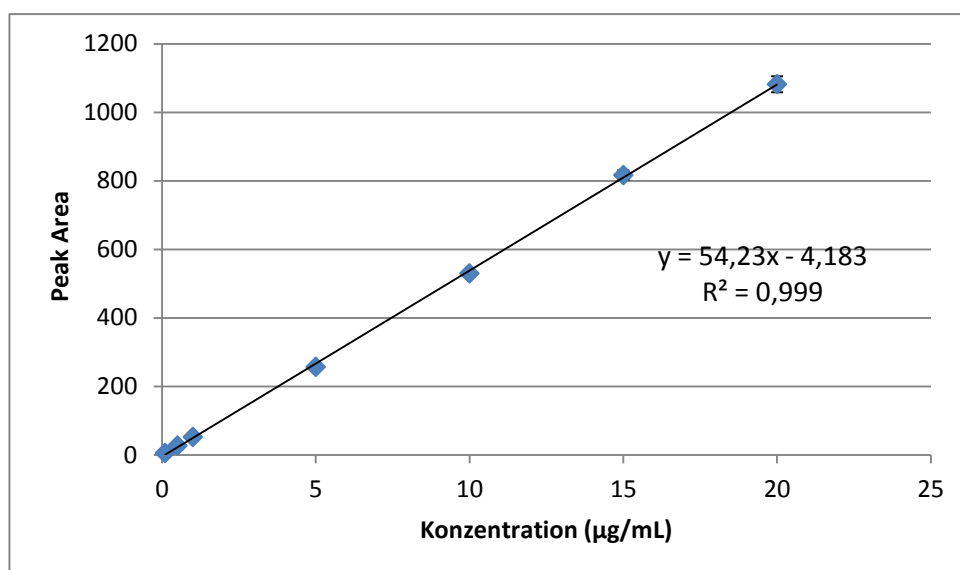


Abb. 2.32: Standardgerade von Altanserin

2.2.3 Ergebnisse

2.2.3.1 Methoden zur Entwicklung eines geeigneten HPLC-Assays

Um einen HPLC-Assay zu finden, der dem von Massarweh et al. [84] gleicht, wurden drei verschiedene Säulen und unterschiedliche Laufmittel getestet. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln zu finden.

2.2.3.1.1 Versuche mit der präparativen HPLC-Säule Chromolith SemiPrep RP-18e

Die präparative HPLC-Säule Chromolith SemiPrep RP-18e weist, im Vergleich zu der von Massarweh verwendeten Säule, ähnliche Trenneigenschaften auf und wurde bereits im Zuge anderer Radiopharmakaproduktionen erfolgreich eingesetzt. Daher wurde diese Säule zusammen mit dem Laufmittel, das Massarweh in seiner Arbeit verwendet hatte, für erste HPLC-Trennversuche eingesetzt.

Zur Ermittlung der passenden Laufmittelzusammensetzung für die Erzielung einer optimalen Trennung von [^{18}F]Altanserin und Precursor wurden einige Versuche mit einer Standardlösung von Altanserin und Nitroaltanserin in Acetonitril mit einer Konzentration von 50 µg/mL durchgeführt. (Abb. 2.33 – 2.35)

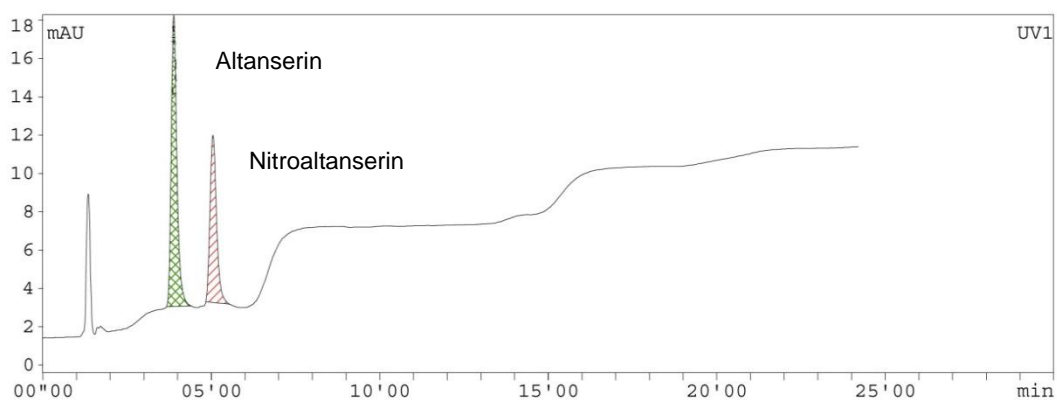


Abb. 2.33: HPLC-Chromatogramm der Standards Altanserin und Nitroaltanserin unter Verwendung des Laufmittels NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 55/18/27 (Flow: 5 mL/min)

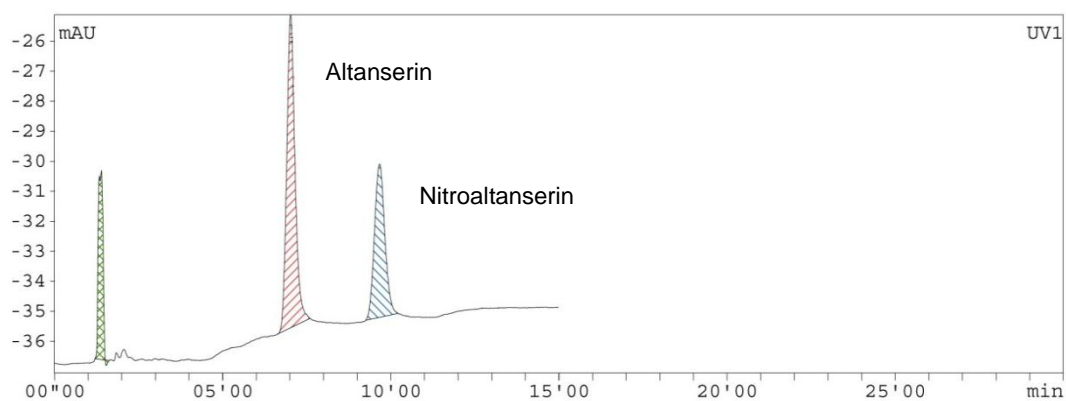


Abb. 2.34: HPLC-Chromatogramm der Standards Altanserin und Nitroaltanserin unter Verwendung des Laufmittels NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 66.5/13.5/20 (Flow: 5 mL/min)

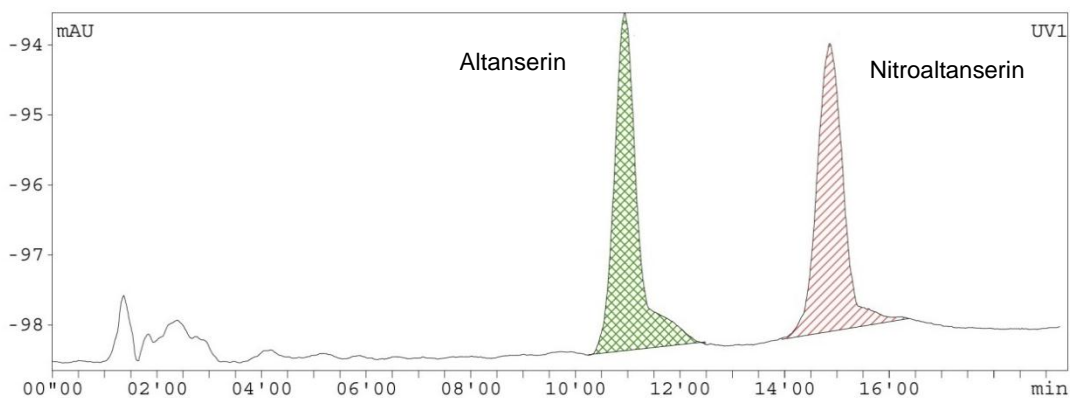


Abb. 2.35: HPLC-Chromatogramm der Standards Altanserin und Nitroaltanserin unter Verwendung des Laufmittels NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2 (Flow: 5 mL/min)

Durch Erhöhung der wässrigen Phase durch schrittweise Zugabe von Natriumacetat-Puffer zum ursprünglichen Laufmittel (NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 55/18/27) konnte schlussendlich mit einer Laufmittelzusammensetzung von NaOAc 0.05N pH 5/ THF/ MeOH: 73/10.8/16.2 und einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 mL/min eine gute Trennung von Altanserin und Nitroaltanserin bei einer Retentionszeit von 10.56 min bzw. 14.52 min erzielt werden. Daher wurde diese Zusammensetzung für erste heiße präparative Trennversuche gewählt.

Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 mL/min und einer Laufmittelzusammensetzung von NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2 konnte [^{18}F]Altanserin mit der Chromolith SemiPrep RP-18e – Säule problemlos aus dem Reaktionsgemisch herausgeschnitten werden. Die Retentionszeiten des Produkts und des Precursors lagen bei ca. 12 min und 14.5 min, sodass das Produkt ohne Precursor-Verunreinigung isoliert werden konnte. Durch die kurzen Retentionszeiten und den geringen Flow kam es folglich auch zu einem niedrigen Laufmittelverbrauch, was ein weiterer Vorteil dieses Assays wäre. Das dazugehörige HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 2.36 illustriert.

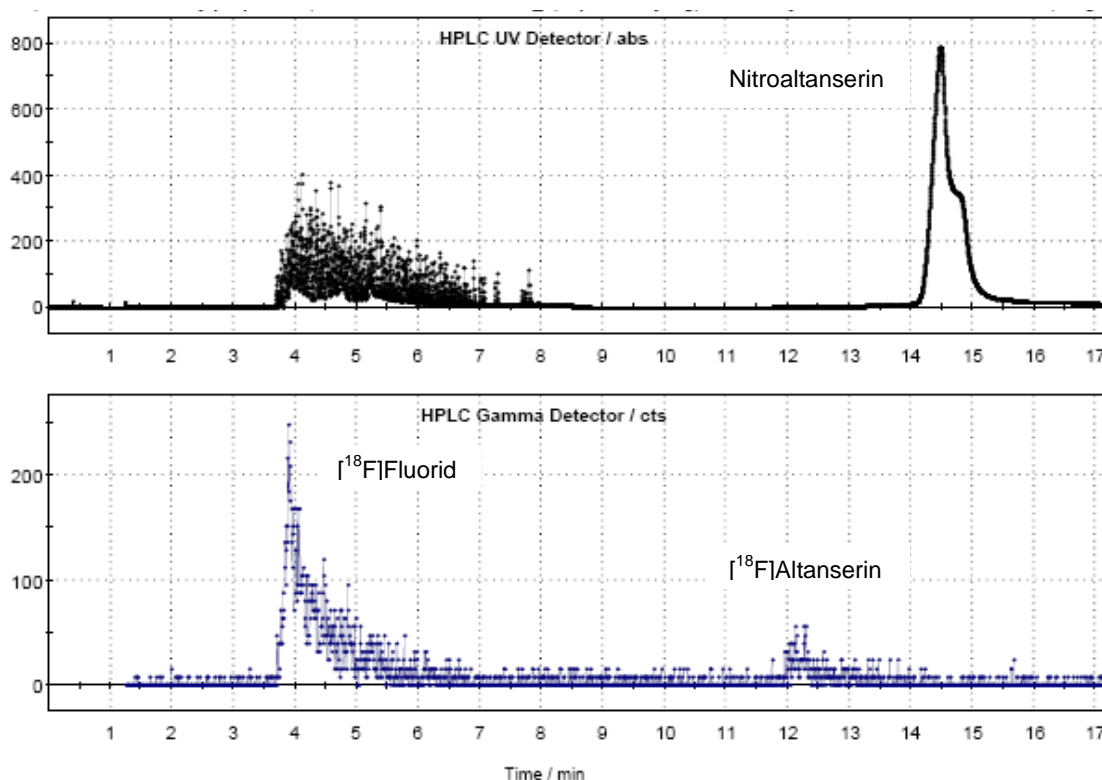


Abb. 2.36: Präparative HPLC-Aufreinigung von [^{18}F]Altanserin (Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2, Durchflussgeschwindigkeit: 5 mL/min)

Nach einigen Chromatographien stellte sich jedoch heraus, dass der Syntheseumsatz von [^{18}F]Altanserin nach der präparativen Auftrennung nicht wiedergefunden werden konnte. Statt einer erwarteten radiochemischen Inkorporation von rund 60% nach der Synthese von [^{18}F]Altanserin konnten im geschnittenen Altanserin-Peak nur 5-10% der Ausgangsaktivität gemessen werden. Zusätzlich konnte man bei der Qualitätskontrolle mittels analytischer HPLC neben [^{18}F]Altanserin sowohl einen [^{18}F]Fluorid-Peak, als auch einen Nitroaltanserin-Peak im Chromatogramm erkennen, weshalb die Vermutung nahe lag, dass eventuell eine Instabilität des Produkts vorliegt.

Mithilfe eines Versuchs wurde die Stabilität von [^{18}F]Altanserin im Laufmittel der analytischen und der präparativen HPLC sowie unverdünnt über einen Zeitraum von 60 Minuten getestet. Dafür wurde das Produkt ohne Vorlage von Laufmittel gesammelt und jeweils 100 μL der unverdünnten Probe wurden mit 900 μL des analytisches Laufmittels (Ammoniumacetat-Puffer 24 mmol pH 5.4/Acetonitril 59:41 (v/v%)) und 900 μL des präparativen Laufmittels (NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2) verdünnt. Für die drei Proben (unverdünnt, verdünnt mit analytischem LM, verdünnt mit präparativem LM) wurde die Zeit gestoppt und nach 0, 5, 15, 30, 45 und 60 Minuten wurde 1 μL jeder Probe auf eine DC-Platte aufgetragen und ausgewertet. Um statistisch brauchbare Ergebnisse zu erhalten, wurde dieser Versuch insgesamt drei Mal durchgeführt. (Abb. 2.37)

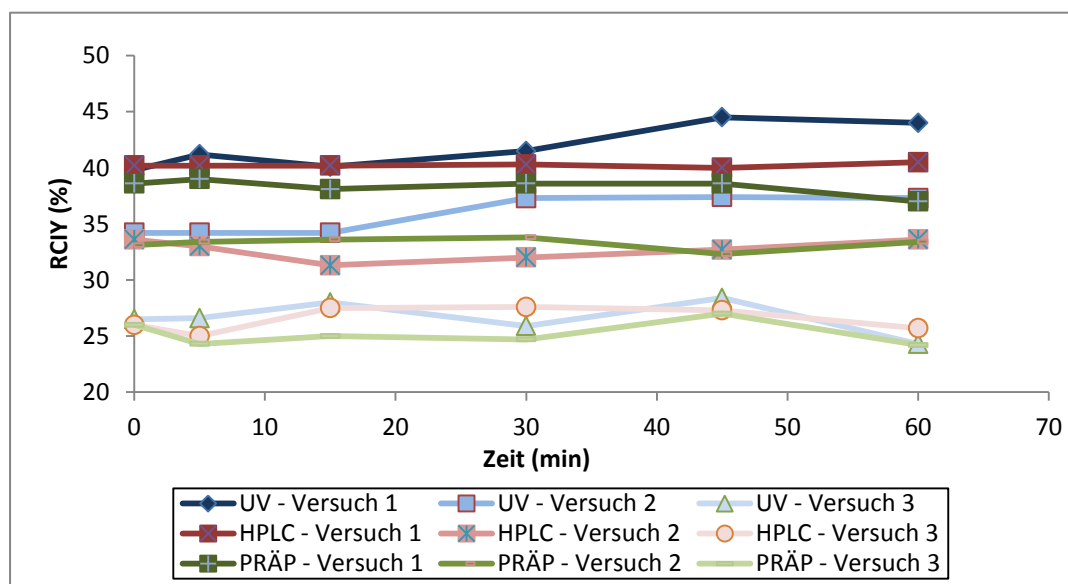


Abb. 2.37: Radiochemische Inkorporationsraten der drei Proben nach 0, 5, 15, 30, 45 und 60 Minuten (UV= unverdünnt, HPLC= mit analytischem HPLC-LM verdünnt, PRÄP = mit präparativem HPLC-LM verdünnt)

Trotz unterschiedlicher radiochemischer Inkorporationsraten der drei Versuche kann man deutlich erkennen, dass [^{18}F]Altanserin sowohl in beiden getesteten Laufmitteln als auch unverdünnt über einen Zeitraum von 60 Minuten stabil ist. Damit konnte ein Radioaktivitätsverlust durch eine Instabilität des Produktes ausgeschlossen werden.

Um herauszufinden, bei welchen Stationen der präparativen Auftrennung Radioaktivität und damit [^{18}F]Altanserin „hängen“ bleibt, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Dafür wurde die Aktivität der Reaktionslösung im Sammelgefäß nach der Synthese gemessen. Anschließend wurde die Reaktionsflüssigkeit aus dem Gefäß über eine Leitung aufgesaugt, durch die Loop geschickt und am Ende der Loop wieder aufgefangen. Die Aktivitäten des „Loop waste“ sowie die des leeren Produktsammelgefäßes wurden bestimmt. Um die Leitungen und die Loop durchspülen zu können, wurde Ethanol in das leere Produktvial gegeben. Dieser wurde wiederum aufgesaugt, durch die Loop geschickt und am Ende der Loop gesammelt. Wieder wurden die Aktivitäten vom „Loop waste“ und vom leeren Gefäß bestimmt. (Tab. 2.11)

| Lamda: 0,00010502 | | | | | | |
|---------------------|-----------------|----------|------------|-----------------------|-----------|---------------|
| | Aktivität (MBq) | Uhrzeit | Δt | $\Delta t/\text{min}$ | A(0)(F18) | Aktivität (%) |
| Ausgangsaktivität | 383,4 | 11:03:00 | 00:00:00 | 0 | 383,40 | 100,00 |
| Loop waste | 234,5 | 11:12:00 | 00:09:00 | 9 | 248,18 | 64,73 |
| Reaktionsgefäß leer | 7,4 | 11:12:00 | 00:09:00 | 9 | 7,83 | 2,04 |
| Loop waste mit EtOH | 77 | 11:17:00 | 00:14:00 | 14 | 84,10 | 21,94 |
| Reaktionsgefäß leer | 5,7 | 11:17:00 | 00:14:00 | 14 | 6,23 | 1,62 |
| Wiederfindung | | | | | | 90,33 |

Tab. 2.11: Verluste an Radioaktivität während der ersten Stationen der präparativen Auftrennung, ausgehend von der Aktivität des Syntheseprodukts (383.4 MBq)

Wie man an den Werten erkennen kann, sind allein durch das Durchlaufen der Reaktionsflüssigkeit durch die Loop ca. 150 MBq (von 383.4 MBq auf 234.5 MBq) an Aktivität abhanden gekommen, was bedeuten würde, dass mehr als ein Drittel der Aktivität in den Leitungen bzw. in der Loop hängen bleibt. Auch nach dem Waschen mit Ethanol konnte noch immer Radioaktivität im „Loop waste“ und im leeren Reaktionsgefäß gefunden werden. Insgesamt konnten 90.33% der Ausgangsaktivität wiedergefunden werden. Um dem enormen Aktivitätsverlust entgegenzuwirken, wurde für die nachfolgenden präparativen Auftrennungen die Leitung vom Produktgefäß zur Loop stark verkürzt.

Da jedoch auch bei den weiteren präparativen HPLC-Auftrennungen trotz hoher Syntheseausbeute kaum [^{18}F]Altanserin von der Säule eluiert wurde, probierte man durch Erhöhung der organischen Phase und damit Änderung der Laufmittelzusammensetzung (NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 15.4/23/61.6) unter Beibehaltung der Durchflusgeschwindigkeit von 5 mL/min, [^{18}F]Altanserin aus der Säule herauszulösen. Da [^{18}F]Altanserin aber auch durch diese Methode nicht aus der Säule herausgebracht werden konnte, wurden die HPLC-Säule und das Laufmittel für weitere Versuche gewechselt.

2.2.3.1.2 Versuche mit der präparativen Säule ProntoSIL 120 C18

Hamacher et al. (2006) [81] verwendeten in ihrer Arbeit für die Isolierung von [^{18}F]Altanserin die HPLC-Säule ProntoSIL 120 C18 ace-EPS mit der Laufmittelzusammensetzung AcN/0.1% TEA pH 6.8: 45/55 bei einer Durchflusgeschwindigkeit von 20 mL/min. Durch die Retentionszeit des Produkts von 23 min hält sich der Verbrauch an Laufmittel trotz hoher Durchflusgeschwindigkeit in Grenzen. Deshalb wurde diese Methode als Alternative gewählt und mit denselben Materialien nachgestellt. (Abb. 2.38)

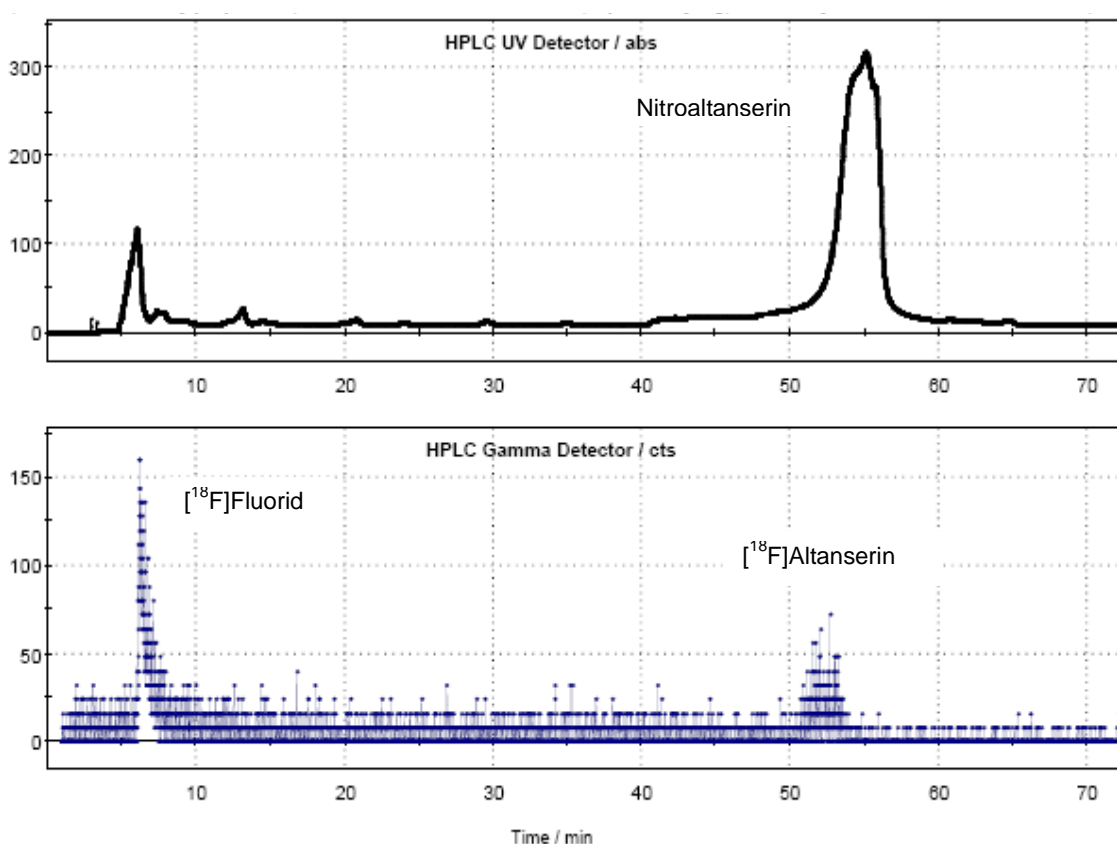


Abb. 2.38: Präparative HPLC-Aufreinigung von [^{18}F]Altanserin (Säule: ProntoSIL 120 C18 ace-EPS, Laufmittel: AcN/0.1% TEA pH 6.8: 45/55, Durchflusgeschwindigkeit: 20 mL/min)

Die von Hamacher publizierte Retentionszeit von 23 min konnte jedoch bei meinem Versuch bei weitem nicht erreicht werden. [^{18}F]Altanserin und Nitroaltanserin wurden erst nach 50 min von der Säule eluiert, zusätzlich kam es zu einer Überlagerung der beiden Peaks, wodurch eine saubere Trennung von Produkt und Precursor unmöglich war. Durch die hohe Durchflussgeschwindigkeit von 20 mL/min und einer Laufzeit von mindestens 50 min ergibt sich ein extrem hoher Verbrauch an Chemikalien, was einen weiteren Nachteil dieser Methode darstellt. Aufgrund dieser Umstände wurden ein weiteres Mal HPLC-Säule und Laufmittel für nachfolgende Versuche gewechselt.

2.2.3.1.3 Versuche mit der präparativen Säule Gemini C18

Die analytische HPLC-Säule Gemini C18 wurde für die Qualitätskontrolle von [^{18}F]Altanserin verwendet und zeigte neben kurzen Retentionszeiten von Produkt und Precursor auch eine gute Trennung der beiden Substanzen. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde die präparative HPLC-Säule Gemini C18 für weitere Versuche gewählt. Zunächst wurde mit einer Laufmittelzusammensetzung von NH_4OAc 24 mmol pH 5.4/ AcN: 65/35 bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 mL/min gearbeitet. Unter diesen Bedingungen wurde [^{18}F]Altanserin nach ca. 16 min von der Säule eluiert, Nitroaltanserin jedoch bereits 1 Minute später, wodurch der [^{18}F]Altanserin-Peak nicht sauber geschnitten werden konnte und mit Precursor verunreinigt war. Um eventuell eine bessere Trennung der Substanzen zu erzielen, wurde die Laufmittelzusammensetzung dahingehend verändert, dass die wässrige Phase erhöht wurde (NH_4OAc 24 mmol pH 5.4/AcN: 82.5/17.5). Die anfängliche Durchflussgeschwindigkeit von 5 mL/min wurde nach ungefähr 30 Minuten auf 13 mL/min erhöht. Leider konnte [^{18}F]Altanserin mit der neuen Laufmittelzusammensetzung erst nach 65 min, Nitroaltanserin erst nach 67 min eluiert werden (Abb. 2.39). Der kurze Zeitabstand zwischen den beiden Substanzen ließ auch diesmal keine vollständige Trennung von Produkt und Precursor zu.

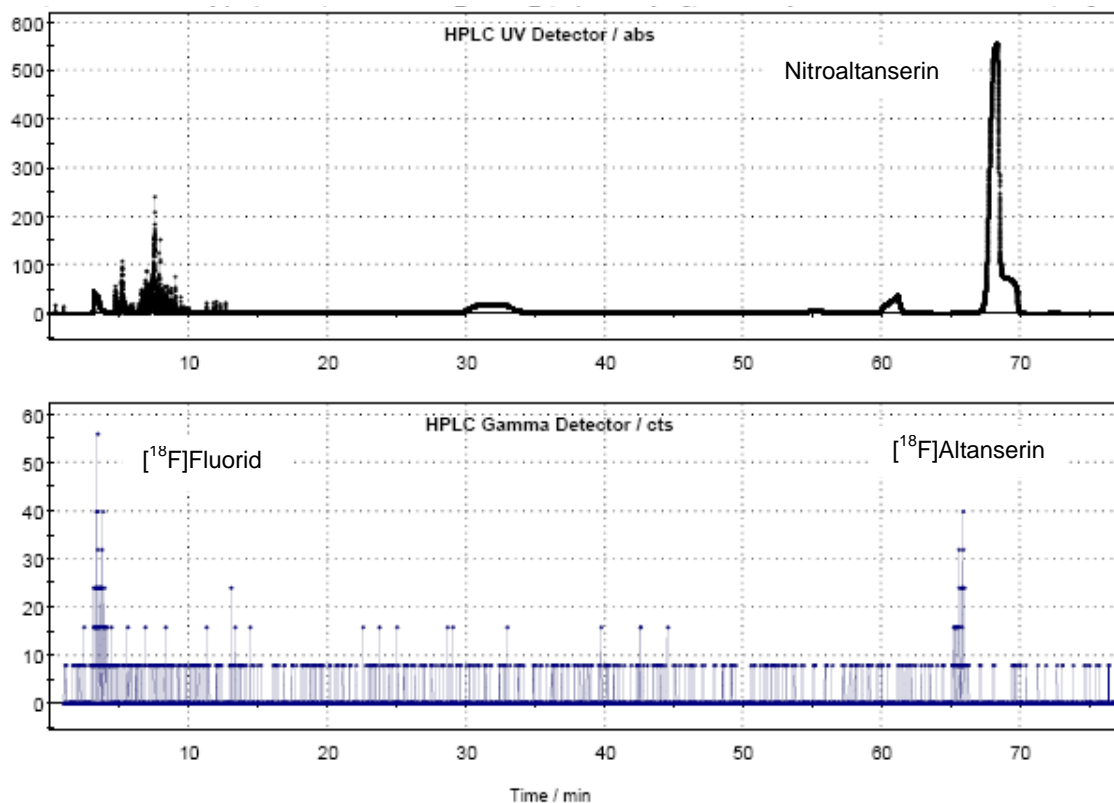


Abb. 2.39: Präparative HPLC-Aufreinigung von [¹⁸F]Altanserin (Säule: Gemini C18, Laufmittel NH₄OAc 24 mmol pH 5.4/AcN: 82.5/17.5, Durchflussgeschwindigkeit: zw. 5 mL/min und 13 mL/min)

Aufgrund dessen wurde das Laufmittel gewechselt und jenes eingesetzt, das zusammen mit der Chromolith Semi-Prep-Säule verwendet wurde (NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2). Die Chromatographie startete mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 15 mL/min, nach 34 Minuten wurde jedoch auf 20 mL/min erhöht. Kurze Zeit später wurde [¹⁸F]Altanserin eluiert und geschnitten. Allerdings konnte auch hier nicht annähernd die eingesetzte Menge eluiert werden. Nach Erscheinen des Nitroaltanserin-Peaks wurde nach 65 min die Laufmittelzusammensetzung und gleichzeitig die Durchflussgeschwindigkeit geändert (NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 15.4/23/61.6, Durchflussgeschwindigkeit 10 mL/min), um eventuell in der Säule hängengebliebene Reste von [¹⁸F]Altanserin eluieren zu können. Da jedoch kein radioaktiver Peak mehr aufgetreten ist, wurde die Chromatographie nach weiteren 20 min abgebrochen.

2.2.4 Diskussion

Um [¹⁸F]Altanserin nach erfolgreicher Synthese mittels Advion NanoTek® LF dem Patienten verabreichen zu können, ist es notwendig, das Produkt mittels präparativer HPLC zu isolieren und Precursor, ungebundenes [¹⁸F]Fluorid und Reaktionslösungsmittel abzutrennen. Für die Entwicklung eines geeigneten HPLC-Trennassays mit einer

kurzer Retentionszeit von [^{18}F]Altanserin und einer geringen Durchflussgeschwindigkeit wurden drei verschiedene Säulen zusammen mit unterschiedlichen Laufmitteln getestet, die in Tabelle 2.12 zusammengefasst sind.

| HPLC-Säule | Laufmittel | Durchflussgeschwindigkeit | Retentionszeit [^{18}F]Altanserin |
|----------------------------|---|---------------------------|---|
| Chromolith SemiPrep RP-18e | NaOAc 0.05N pH=5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2 | 5 mL/min | 12 min |
| ProntoSIL 120 C18 ace-EPS | AcN/0.1% TEA pH=6.8: 45/55 | 20 mL/min | 50 min |
| Gemini C-18 | NH ₄ OAc 24mmol pH=5.4/AcN: 65/35 | 5 mL/min | 16 min |
| Gemini C-18 | NH ₄ OAc 24mmol pH=5.4/AcN: 82.5/ 17.5 | 5 mL/min - 13 mL/min | 65 min |
| Gemini C-18 | NaOAc 0.05N pH=5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2 | 15 mL/min - 20 mL/min | 36 min |

Tab. 2.12: Auflistung der verwendeten präparativen HPLC-Säulen und Laufmittel, der eingesetzten Durchflussgeschwindigkeiten sowie der entsprechenden Retentionszeiten von [^{18}F]Altanserin

Die präparative HPLC-Säule Chromolith SemiPrep RP-18e konnte zwar den Anforderungen einer kurzen Retentionszeit des Produkts (12 min) und einer niedrigen Durchflussgeschwindigkeit (5 mL/min) gerecht werden, allerdings stellte sich nach einigen Versuchen heraus, dass der Großteil des Produkts (~90%) in der Säule verbleibt (vermutlich durch Wechselwirkungen mit Bestandteilen der Säule). Da das zurückgebliebene [^{18}F]Altanserin auch durch starke Erhöhung des Methanol-Anteils im Laufmittel nicht von der Säule eluiert werden konnte, ist diese Methode als ungeeignet anzusehen.

Bei den anderen beiden getesteten präparativen HPLC-Säulen, ProntoSIL 120 C18 und Gemini C18, konnte mit den verwendeten Laufmitteln (Tab. 2.12) keine ausreichende Trennung von [^{18}F]Altanserin und Precursor erzielt werden, sodass im geschnittenen Produktpeak immer eine gewisse Menge an Nitroaltanserin mittels analytischer HPLC nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich kam es zu sehr langen Retentionszeiten des Produkts von 50 min bei ProntoSIL 120 C18 und 65 min bei Gemini C18 und damit verbunden ergibt sich ein extrem hoher Verbrauch an Chemikalien, da die Chromatographien in beiden Fällen mit hohen Durchflussgeschwindigkeiten durchgeführt wurden. Abgesehen von den dargelegten Nachteilen der beiden Methoden macht die Tatsache, dass Produkt und Precursor in beiden

Fällen nicht vollständig getrennt werden konnten, eine Anwendung für Patientensynthesen unmöglich.

Die abschließende Formulierung des geschnittenen [^{18}F]Altanserin-Peaks konnte nur nach Produktisolierung mit der Chromolith SemiPrep RP-18e – Säule durchgeführt werden, da hier das Produkt ohne Verunreinigungen isoliert werden konnte. Die Aufreinigung selbst wurde manuell durchgeführt. Dieser Schritt wurde noch nicht automatisiert, da noch keine geeigneten HPLC-Parameter gefunden wurden.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Meine Diplomarbeit beschäftigt sich mit dem Thema der Synthese von [^{18}F]Altanserin aus dem Precursor Nitroaltanserin und der anschließenden Isolierung, Aufreinigung und Formulierung des Produkts, um die Applikation an Patienten zu ermöglichen.

Die Synthese wurde unter Anwendung eines Mikrofluidsystems mit der Bezeichnung Advion NanoTek[®] LF durchgeführt. Nach einer Vielzahl von Synthesen konnten die optimalen Reaktionsbedingungen für eine größtmögliche radiochemische Inkorporation ermittelt werden. Bei einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL (in Reaktionslösung) und einer Reaktionstemperatur von 220°C konnte mit einem Volumen von je 400 μL Precursor bzw. [^{18}F]Fluorid bei einer Durchflussgeschwindigkeit von insgesamt 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ eine radiochemische Inkorporation von $42.2 \pm 16.4\%$ erreicht werden.

Für die Applikation von [^{18}F]Altanserin an Patienten war es notwendig, das zuvor synthetisierte Produkt entsprechend aufzureinigen, um Precursor, ungebundenes [^{18}F]Fluorid und DMSO-Reste zu entfernen. Für die Isolierung von [^{18}F]Altanserin wurde zwar ein geeigneter präparativer HPLC-Assay gefunden [84], dieser konnte jedoch nicht getestet werden, da die dafür notwendige HPLC-Säule in der Arbeitsgruppe nicht zugänglich war und eine Beschaffung mehrere Wochen gedauert hätte. Als Alternative wurden Versuche mit drei andere Säulen mit ähnlichen Trenneigenschaften und verschiedenen Laufmitteln durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Retentionszeiten von Produkt und Precursor, der Durchflussgeschwindigkeit und damit des Laufmittelverbrauchs und der radiochemischen Inkorporationsraten wurde eine Reihe von präparativen HPLC-Auftrennungen durchgeführt. Bedauerlicherweise konnte mit den getesteten Säulen kein optimaler präparativer HPLC-Assay gefunden werden, da entweder die Retentionszeiten und gleichzeitig die Durchflussgeschwindigkeiten zu hoch waren, die radiochemische Ausbeute nicht ausreichend war oder das Produkt mit Nitroaltanserin verunreinigt war. Deshalb wurde die Besorgung der HPLC-Säule (Waters Symmetry Prep-7 μm C18), die im Rahmen der Arbeit von Massarweh et al. [84] verwendet wurde, eingeleitet. Diese konnte allerdings erst nach Beendigung der Diplomarbeit geliefert werden.

Die Formulierung des Produkts nach der präparativen HPLC wurde händisch getestet. Für „scaled-up“ Patientensynthesen ist allerdings eine Automatisierung im direkten Anschluss an die präparative HPLC-Auftrennung mit Hilfe des Moduls GETracerlab F_XF_N notwendig und geplant.

Bei der Synthese von [^{18}F]Altanserin mit dem Modul NanoTek[®] LF kam es bis auf gelegentliche Verstopfungen der Kapillare im Reaktor, die zu einem Abbruch der Synthese führten, zu keinen nennenswerten Problemen. Verbesserungswürdig ist jedoch die Methode der Produktisolierung mittels präparativer HPLC; entsprechende Maßnahmen wurden (wie schon erwähnt) bereits in die Wege geleitet. In weiterer Folge sind nun diverse Versuche mit der Säule Symmetry Prep-7 μm C18 notwendig, um eine Abtrennung von [^{18}F]Altanserin unter guten Bedingungen erreichen zu können. Jedoch konnte aus den bereits erfolgten Versuchen zur weiteren Produktaufreinigung und Formulierung gezeigt werden, dass eine einfache Implementierung und Automatisierung erfolgen kann, sobald ein geeigneter HPLC-Assay aufgesetzt wurde. Die Qualitätskontrolle wurde hinsichtlich der chemischen Reinheit und der radiochemischen Identität durch den beschriebenen HPLC-Assay, hinsichtlich der radiochemischen Reinheit durch den beschriebenen DC-Assay durchgeführt.

A Literaturverzeichnis

- [1] Schirmacher R., Wängler C., Schirmacher E.: Fluorine-18 Radiochemistry: Theory and Practice. In: Wester H.J.: Pharmaceutical Radiochemistry (I), Munich Molecular Imaging Handbook Series. Scintomics Print Media and Publishing (2010), S. 5-9
- [2] <http://de.wikipedia.org/wiki/Radioaktivit%C3%A4t> (07.10.2011, 20:54)
- [3] Vallabhajosula S.: Molecular Imaging, Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2009), S. 38
- [4] Vallabhajosula S.: Molecular Imaging, Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2009), S. 60
- [5] Coenen H.H.: Fluorine-18 Labeling Methods: Features and Possibilities of Basic Reactions. In: Schubinger P.A., Lehmann L., Friebe M., editors: PET Chemistry: The Driving Force in Molecular Imaging. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2007), S.16-26
- [6] Neumüller O.-A.: Römpps Chemie Lexikon, Frank'sche Verlagshandlung (1983), Auflage 8, S. 1612–1613
- [7] http://uwa.physik.uni-oldenburg.de/1583.html#_3.3 (03.01.2012, 14:28)
- [8] Vallabhajosula S.: Molecular Imaging, Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2009), S. 151-161
- [9] Schirmacher R., Wängler C., Schirmacher E.: Fluorine-18 Radiochemistry: Theory and Practice. In: Wester H.J.: Pharmaceutical Radiochemistry (I), Munich Molecular Imaging Handbook Series. Scintomics Print Media and Publishing (2010), S. 67
- [10] Wallach O.: Über das Verhalten einiger Diazo- und Diazoamidverbindungen. Justus Liebigs Ann Chem (1886), 235:242-255
- [11] Balz G., Schiemann G.: Über aromatische Fluorverbindungen, I: Ein neues Verfahren zu ihrer Darstellung. Chem Ber (1927), 60:1186-1190
- [12] Visser G.W.M, Bakker C.N.M., Herscheid J.D.M., Brinkman G., Hoekstra A.: The chemical properties of [^{18}F]-acetylhypofluorite in acetic acid solution. J Label Compd Radiopharm (1984), 21:1226
- [13] Chirakal R., Firnau G., Schrobilgen G.J., McKay J., Garnett E.S.: The synthesis of [^{18}F]xenon difluoride from [^{18}F]fluorine gas. Appl Radiat Isot (1984), 35:401-404
- [14] Vallabhajosula S.: Molecular Imaging, Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2009), S. 157
- [15] Hamacher K., Coenen H.H., Stöcklin G.: Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[^{18}F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. J Nucl Med (1986), 27(2):235-238
- [16] Mitterhauser M.: Mitschrift zur Vorlesung Radiopharmazeutische Technologie I (WS 2009)
- [17] <http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/me/2004/stoeber.pdf> (03.01.2012, 14:54)
- [18] Kauhanen S., Seppänen M., Minn H., Gullichsen R., Salonen A., Alanen K., Parkkola R., Solin O., Bergman J., Sane T., Salmi J., Välimäki M., Nuutila P.: Fluorine-18-L-Dihydroxyphenylalanine (^{18}F -DOPA) Positron Emission Tomography as a Tool to Localize an Insulinoma or β -Cell Hyperplasia in Adult Patients. J Clin Endocrinol Metab (2007), 92(4):1237-1244

- [19] Watts P., Haswell S.J.: Microfluidic combinatorial chemistry. *Curr Opin Chem Biol* (2003), 7:380-387
- [20] Yoshida J., Nagaki A., Yamada T.: Flash Chemistry: Fast Chemical Synthesis by Using Microreactors. *Chem Eur J* (2008), 14:7450-7459
- [21] Palmieri A., Ley S.V., Hammond K., Polyzos A., Baxendale I.R.: A microfluidic flow chemistry platform for organic synthesis: the Hofmann rearrangement. *Tetrahedron Lett* (2009), 50:3287-3289
- [22] Watts P., Haswell S.J.: Continuous flow reactors for drug discovery. *Drug Discov Today* (2003), 8:586-593
- [23] DeWitt S.H.: Microreactors for chemical synthesis. *Curr Opin Chem Biol* (1999), 3:350-356
- [24] Watts P., Wiles C.: Micro reactors: a new tool for the synthetic chemist. *Org Biomol Chem* (2007), 5:727-732
- [25] Watts P.: Chemical Synthesis in Micro Reactors. *Chem Ing Tech* (2004), 76, No. 5
- [26] Elizarov A.M.: Microreactors for radiopharmaceutical synthesis. *Lab Chip* (2009), 9:1326-1333
- [27] Lu S., Chun J.-H., Pike V.W.: Fluorine-18 chemistry in micro-reactors. *J Labelled Comp Radiopharm* (2010), 53(5-6):234-238
- [28] Lu S., Giamis A.M., Pike V.W.: Synthesis of [^{18}F]fallypride in a micro-reactor: rapid optimization and multiple-production in small doses for micro-PET studies. *Curr Radiopharm* (2009), 2:49-55
- [29] Lu S.Y., Pike V.W.: Micro-reactors for PET Tracer Labeling. In: Schubinger P.A., Lehmann L., Friebe M., editors: *PET Chemistry: The Driving Force in Molecular Imaging*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2007), S. 271-287
- [30] Gillies J.M., Prenant C., Chimon G.N., Smethurst G.J., Perrie W., Hamblett I., Dekker B., Zweit J.: Microfluidic reactor for the radiosynthesis of PET radiotracers. *Appl Radiat Isot* (2006), 64:325-332
- [31] Gillies J.M., Prenant C., Chimon G.N., Smethurst G.J., Dekker B.A., Zweit J.: Microfluidic technology for PET radiochemistry. *Appl Radiat Isot* (2006), 64:333-336
- [32] http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=472301|SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC (28.12.2011, 12:37)
- [33] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=Product%20No.%7C&N4=34998-4X4L%7C&N25=0&QS=ON&F=SPEC> (07.03.2012, 10:14)
- [34] Ungersboeck J., Philippe C., Mien L.-K., Haeusler D., Shanab K., Lanzenberger R., Spreitzer H., Keppler B.K., Dudczak R., Kletter K., Mitterhauser M., Wadsak W.: Microfluidic preparation of [^{18}F]FE@SUPPY and [^{18}F]FE@SUPPY:2 – comparison with conventional radiosyntheses. *Nucl Med Biol* (2011), 38(3):427-434
- [35] Rapport M.M., Green A.A., Page I.H.: Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* (1948), 176(3):1243–1251
- [36] <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-2610/610.pdf> (23.08.2011, 11:56)
- [37] Fleischhacker W., Noe C.: Skriptum zur Vorlesung Pharmazeutische Chemie, Teil 3 (SS 2010)
- [38] Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Ruth P., Schäfer-Korting M.: *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Auflage 9 (2008), S. 476-479

- [39] Müller-Esterl W.: Biochemie, Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Auflage 1 (2004), S. 600
- [40] Saxena P.R., Lawang A.: A comparison of cardiovascular and smooth muscle effects of 5-hydroxytryptamine and 5-carboxamidotryptamine, a selective agonist of 5-HT₁ receptors. Arch Int Pharmacodyn Ther (1985), 277(2):235–252
- [41] Prchal J.T., Lichtman M.A., Williams W.A., Beutler E., Kaushansky K., Kipps T.J., Seligsohn U.: Williams hematology. McGraw-Hill, New York (2006)
- [42] Bülbring E., Crema A.: The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa. J Physiol (1959), 146(1):18–28
- [43] Thews G., Mutschler E., Vaupel P.: Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. Auflage 5 (1999), S. 98
- [44] Mitterhauser M.: Mitschrift zur Vorlesung Radiopharmazeutische Technologie II (SS 2010)
- [45] Hering S., Hoffmann O., Studenik C., Lemmens-Gruber R.: Skriptum zur Vorlesung Pharmakologie, Teil 2 (SS 2009)
- [46] Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Ruth P., Schäfer-Korting M.: Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Auflage 9 (2008), S. 173-175
- [47] http://www.cnsforum.com/imagebank/item/5HT_rcpt_subtypes/default.aspx (25.10.2011, 09:47)
- [48] Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R., Humphrey P.P.: International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). Pharmacol Rev (1994), 46(2):157–203
- [49] Müller-Esterl W.: Biochemie, Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Auflage 1 (2004), S. 403-418
- [50] Ramadan N.M., Skljarevski V., Phebus L.A., Johnson K.W.: 5-HT_{1F} receptor agonists in acute migraine treatment: a hypothesis. Cephalalgia (2003), 23(8):776–785
- [51] Nelson D.L.: 5-HT₅ receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord (2004), 3(1):53–58
- [52] Roth B.L., Craig S.C., Choudhary M.S., Uluer A., Monsma F.J., Shen Y., Meltzer H.Y., Sibley D.R.: Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. J Pharmacol Exp Ther (1994), 268(3):1403–1410
- [53] Miller P.W., Long N.J., Vilar R., Gee A.D.: Synthesis of ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N Radiolabels for Positron Emission Tomography. Angew Chem Int Ed (2008), 47:8998-9033
- [54] Andrée B., Halldin C, Pike V.W., Gunn R.N., Olsson H., Farde L.: The PET Radioligand [*carbonyl*-¹¹C]Desmethyl-WAY-100635 Binds to 5-HT_{1A} Receptors and Provides a Higher Radioactive Signal Than [*carbonyl*-¹¹C]WAY-100635 in the Human Brain. J Nucl Med (2002), 43:292-303
- [55] Akimova E., Lanzenberger R., Kasper S.: The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders. Biol Psychiatry (2009), 66(7):627-635
- [56] Houle S., Ginovart N., Hussey D., Meyer J.H., Wilson A.A.: Imaging the serotonin transporter with positron emission tomography: initial human studies with [¹¹C]DAPP and [¹¹C]DASB. Eur J Nucl Med (2000), 27(11):1719–1722
- [57] Meyer J.H.: Imaging the serotonin transporter during major depressive disorder and antidepressant treatment. J Psychiatry Neurosci (2007), 32(2):86–102.

- [58] Naughton M., Mulrooney J. B., Leonard B.E.: A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Hum Psychopharm Clin* (2000), 15(6):397-415
- [59] Bailer U.F., Price J.C., Meltzer C.C., Mathis C.A., Frank G.K., Weissfeld L., McConaha C.W., Henry S.E., Brooks-Achenbach S., Barbarich N.C., Kaye W.H.: Altered 5-HT_{2A} Receptor Binding after Recovery from Bulimia-Type Anorexia Nervosa: Relationships to Harm Avoidance and Drive for Thinness. *Neuropsychopharmacol* (2004), 29:1143-1155
- [60] Frank G.K., Kaye W.H., Meltzer C.C., Price J.C., Greer P., McConaha C., Skovira K.: Reduced 5-HT_{2A} Receptor Binding after Recovery from Anorexia Nervosa. *Biol Psychiatry* (2002), 52(9):896-906
- [61] Meltzer C.C., Price J.C., Mathis C.A., Greer P.J., Cantwell M.N., Houck P.R., Mulsant B.H., Ben-Eliezer D., Lopresti B., DeKosky S.T., Reynolds C.F.: PET Imaging of Serotonin Type 2A Receptors in Late-Life Neuropsychiatric Disorders. *Am J Psychiatry* (1999), 156:1871-1878
- [62] Dewey S.L., Smith G.S., Logan J., Brodie J.D.: Modulation of central cholinergic activity by GABA and serotonin: PET studies with ¹¹C-benzotropine in primates. *Neuropsychopharmacol* (1993), 8(4):371-376
- [63] Shiue C.Y., Fowler J.S., Wolf A.P., Watanabe M., Arnett C.D.: Syntheses and specific activity determinations of no-carrier-added (NCA) F-18-labeled butyrophenone neuroleptics--benperidol, haloperidol, spiroperidol, and pipamperone. *J Nucl Med* (1985), 26(2):181-186
- [64] Wong D.F., Wagner H. N., Dannals R.F., Links J.M., Frost J.J., Ravert H.T., Wilson A.A., Rosenbaum A.E., Gjedde A., Douglass K.H. and al. et: Effects of Age on Dopamine and Serotonin Receptors measured by positron Tomography in the Living Human Brain. *Science* (1984), 226:1393-1396
- [65] Blin J., Pappata S., Kiyosawa M., Crouzel C., Baron J.C.: [¹⁸F]Setoperone: A new high-affinity ligand for positron emission tomography study of the serotonin-2 receptors in baboon brain in vivo. *Eur J Pharmacol* (1988), 147(1):73-82
- [66] van Dyck C.H., Tan P.-Z., Baldwin R.M., Amici L.A., Garg P.K., Ng C.K., Soufer R., Charney D.S., Innis R.B.: PET Quantification of 5-HT_{2A} Receptors in the Human Brain: A constant Infusion Paradigm with [¹⁸F]Altanserin. *J Nucl Med* (2000), 41:234-241
- [67] Tan P.-Z., Baldwin R.M., van Dyck C.H., Al-Tikriti M., Roth B., Khan N., Charney D.S., Innis R.B.: Characterization of Radioactive Metabolites of 5-HT_{2A} Receptor PET Ligand [¹⁸F]Altanserin in Human and Rodent. *Nucl Med Biol* (1999), 26:601-608
- [68] Leysen J.E.: Use of 5-HT receptor agonists and antagonists for the characterization of their respective receptor sites. In: *Drugs as Tools in Neurotransmitter Research*. Neuromethods (1989), 12:299-350
- [69] Sadzot B., Lemaire C., Maquet P., Salmon E., Plenevaux A., Degueldre C., Hermanne J.P., Guillaume M., Cantineau R., Comar D., Franck G.: Serotonin 5-HT₂ Receptor Imaging in the Human Brain Using Positron Emission Tomography and a New Radioligand, [¹⁸F]Altanserin: Results in Young Normal Controls. *J Cereb Blood Flow Metab* (1995), 15:787-797
- [70] Pinborg L.H., Adams K.H., Svarer C., Holm S., Hasselbalch S.G., Haugbol S., Madsen J., Knudsen G.M.: Quantification of 5-HT_{2A} Receptor in the Human Brain Using [¹⁸F]Altanserin-PET and the Bolus/Infusion Approach. *J Cereb Blood Flow Metab* (2003), 23:985-996

- [71] Biver F., Goldman S., Luxen A., Monclus M., Forestini M., Mendlewicz J., Lotstra F.: Multicompartmental study of fluorine-18 altanserin binding to brain 5HT₂ receptors in humans using positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* (1994), 21:937-946
- [72] Biver F., Lotstra F., Monclus M., Wikler D., Damhaut P., Mendlewicz J., Goldman S.: Sex difference in 5HT₂ receptor in the living human brain. *Neurosci Lett* (1996); 204:25-28
- [73] Meltzer C.C., Smith G., Price J.C., Reynolds III C.F., Mathis C.A., Greer P., Lopresti B., Mintun M.A., Pollock B.G., Ben-Eliezer D., Cantwell M.N., Kaye W., DeKosky S.T.: Reduced binding of [¹⁸F]altanserin to serotonin type 2A receptors in aging: persistence of effect after partial volume correction. *Brain Res* (1998), 813:167-171
- [74] Sheline Y.I., Mintun M.A., Moerlein S.M., Snyder A.Z.: Greater loss of 5-HT(2A) receptors in midlife than in late life. *Am J Psychiatry* (2002), 159:430-435
- [75] Adams K.H., Hansen E.S., Pinborg L.H., Hasselbalch S.G., Svarer C., Holm S., Bolwig T.G., Knudsen G.M.: Patients with obsessive-compulsive disorder have increased 5-HT_{2A} receptor binding in the caudate nuclei. *Int J Neuropsychopharmacol* (2005), 8:391-401
- [76] Adams K.H., Pinborg L.H., Svarer C., Hasselbalch S.G., Holm S., Haugbol S., Madsen K., Frokjaer V., Martiny L., Paulson O.B., Knudsen G.M.: A database of [¹⁸F]Altanserin binding to 5-HT_{2A} receptors in normal volunteers: normative data and relationship to physiological and demographic variables. *NeuroImage* (2004), 21:1105-1113
- [77] van Zwieten P.A., Blauw G.J., van Brummelen P.: Pharmacological profile of antihypertensive drugs with serotonin receptor and alpha-adrenoceptor activity. *Drugs* (1990), 40 Suppl 4:1-8; discussion 28-30
- [78] Lemaire C., Cantineau R., Guillaume M., Plenevaux A., Christiaens L.: Fluorine-18-Altanserin: A Radioligand for the Study of Serotonin Receptors with PET: Radiolabeling and In Vivo Biologic Behavior in Rats. *J Nucl Med* (1991), 32:2266-2272
- [79] Tan P.-Z., Baldwin R.M., Soufer R., Garg P.K., Charney D.S., Innis R.B.: A complete remote-control system for reliable preparation of [¹⁸F]Altanserin. *Appl Radiat Isot* (1999), 50:923-927
- [80] Monclus M., van Naemen J., Mulleneers E., Damhaut P., Luxen A., Goldman S.: Automatic Synthesis of [¹⁸F]Altanserin, a Radiopharmaceutical for Positron Emission Tomographic Studies of the Serotonergic Type-2 Receptors. *Clin Positron Imaging* (1998), 1:111-116
- [81] Hamacher K., Coenen H.H.: No-carrier-added nucleophilic ¹⁸F-labelling in an electrochemical cell exemplified by the routine production of [¹⁸F]altanserin. *Appl Radiat Isot* (2006), 64:989-994
- [82] Collier L.: Application Note: Preparation for [F-18]Altanserin using the NanoTek[®] LF; www.advion.com (16.09.2011, 10:18)
- [83] http://www.solvent--recycling.com/azeotrope_1.html (09.09.2011, 14:57)
- [84] Massarweh G., Kovacevic M., Rosa-Neto P., Evans A.C., Diksic M., Schirmacher R.: Time-efficient and convenient synthesis of [¹⁸F]altanserin for human PET imaging by a new work-up procedure. *Appl Radiat Isot* (2009), 67:2040-2043
- [85] Hasler F., Kuznetsova O.F., Krasikova R.N., Cservenyak T., Quednow B.B., Volenweider F.X., Ametamey S.M., Westera G.: GMP-compliant radiosynthesis of

[¹⁸F]altanserin and human plasma metabolite studies. Appl Radiat Isot (2009), 67:598-601

B Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|--|
| AcN | Acetonitril |
| [¹⁸ F]Altanserin | 3-[2-[4-(4-[¹⁸ F]Fluorobenzoyl)-1-piperidyl]ethyl]-2-sulfanyl-3H-quinazolin-4-on |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| [¹¹ C]DASB | 3-amino-4-[2-[(di(methyl)amino)methyl]phenyl]sulfanylbenzonitril |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EtOH | Ethanol |
| ¹⁸ F | Fluor-18 |
| ¹⁹ F | Fluor-19 |
| [¹⁸ F] ⁻ | [¹⁸ F]Fluorid |
| [¹⁸ F]F ₂ | Fluor-Gas |
| [¹⁸ F]FDG | [¹⁸ F]fluoro-2-desoxy-D-glucose |
| [¹⁸ F]FET | [¹⁸ F]Fluorethyltyrosin |
| GABA | Gamma-Aminobuttersäure |
| G _i -Protein | inhibierendes G-Protein |
| G _q -Protein | G-Protein ohne spezifische Bedeutung |
| G _s -Protein | stimulierendes G-Protein |
| HCl | Salzsäure |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamin |
| keV | Kilo-Elektronenvolt |
| LM | Laufmittel |
| LSD | Lysergsäurediethylamin |
| MAO | Monoaminoxidase |
| MeOH | Methanol |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOAc | Natriumacetat Trihydrat |
| NH ₄ OAc | Ammoniumacetat |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| RCIY | radiochemische Inkorporation (radiochemical incorporation yield) |
| SERT | Serotonin-Transporter |
| SSRI | Selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer |
| TEA | Triethylamin |
| THF | Tetrahydrofuran |
| [¹¹ C]WAY-100635 | N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]- N-(2-pyridyl)cyclohexancarboxamid |
| ZNS | Zentralnervensystem |

C Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------|--|----|
| Abb. 1.1: | Darstellung von [^{18}F]F ₂ über Methyljodid (CH ₃ I) [9] | 3 |
| Abb. 1.2: | Synthese von [^{18}F]fluoro-2-desoxy-D-glucose ([^{18}F]FDG) (modifiziert nach [14]) | 5 |
| Abb. 1.3: | Das Mikrofluidsystem Advion NanoTek [®] LF | 9 |
| Abb. 1.4: | Mikroreaktor des Advion NanoTek [®] LF | 9 |
| Abb. 1.5: | Schematische Darstellung des Set-ups des Mikrofluidsystems NanoTek [®] LF (modifiziert nach [34]) | 10 |
| Abb. 1.6: | Biosynthese und Biotransformation von Serotonin (modifiziert nach [38]) | 11 |
| Abb. 1.7: | Klassifizierung des serotonergen Systems [47] | 14 |
| Abb. 1.8: | 3-[2-[4-(4-[^{18}F]Fluorobenzoyl)-1-piperidyl]ethyl]-2-sulfanyl-3H- quinazolin-4-on ([^{18}F]Altanserin)..... | 18 |
| Abb. 2.1: | Reaktion Nitroaltanserin → [^{18}F]Altanserin (modifiziert nach [78]) | 21 |
| Abb. 2.2: | Screenshot des “Discovery” Modes des Advion NanoTek [®] LF | 28 |
| Abb. 2.3: | Darstellung des Reaktionsverlaufs mittels Druckkurven von Pumpe 1 und Pumpe 3 | 29 |
| Abb. 2.4: | Chromatographische Auftrennung von [^{18}F]Fluorid und [^{18}F]Altanserin mittels DC | 32 |
| Abb. 2.5: | Analytisches HPLC-Chromatogramm zur Identifizierung der einzelnen Komponenten in Reaktionslösung (obere Reihe: UV-Kanal, untere Reihe: Radioaktivitätskanal) | 33 |
| Abb. 2.6: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit der Precursor- Konzentration bei 220°C, einem Volumen von 5 bzw. 10 µL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 15 (16) µL/min | 35 |
| Abb. 2.7: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit der Precursor- Konzentration bei 220°C, 10 µL/min Durchflussgeschwindigkeit und unterschiedlichen Volumina (5, 10, 30 und 120 µL) | 36 |
| Abb. 2.8: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit der Precursor- Konzentration bei 200°C bzw. 220°C, 40 bzw. 60 µL/min Durchflussgeschwindigkeit und Volumina von 5 µL bzw. 10 µL | 36 |
| Abb. 2.9: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei einer Precursor-Konzentration von 1 mg/mL, einem Volumen von 10 bzw. 50 µL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 60 µL/min | 37 |
| Abb. 2.10: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei einer Precursor-Konzentration von 2.5 mg/mL, einem Volumen von 10 µL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 20 µL/min | 37 |
| Abb. 2.11: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei einer Precursor-Konzentration von 5 mg/mL, einem Volumen von 5 µL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 16 µL/min | 38 |

| | | |
|------------|---|----|
| Abb. 2.12: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL, einem Volumen von 15 µL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 15 µL/min. Die dargestellten Versuche wurden an zwei unterschiedlichen Tagen (20.04.2011 und 16.05.2011) durchgeführt. | 39 |
| Abb. 2.13: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit bei einer Precursor-Konzentration von 1 mg/mL, einer Temperatur von 220°C und einem Volumen von 5 bzw. 10 µL | 39 |
| Abb. 2.14: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit bei einer Precursor-Konzentration von 1 mg/mL, einer Temperatur von 180°C und einem Volumen von 10 µL | 40 |
| Abb. 2.15: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit bei einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL, einer Temperatur von 220°C und einem Volumen von 5, 10 bzw. 30 µL | 40 |
| Abb. 2.16: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Durchflussgeschwindigkeit bei einer Precursor-Konzentration von 2.5 mg/mL, einer Temperatur von 180°C und einem Volumen von 10 µL | 41 |
| Abb. 2.17: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit vom Volumen bei einer Reaktionstemperatur von 220°C, einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 10, 20, 40 und 60 µL/min | 42 |
| Abb. 2.18: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit vom Volumen bei einer Reaktionstemperatur von 220°C, einer Precursor-Konzentration von 2 mg/mL und einer Durchflussgeschwindigkeit von 10, 20 und 60 µL/min | 42 |
| Abb. 2.19: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Verweildauer von Precursor und [¹⁸ F]Fluorid im Reaktor | 43 |
| Abb. 2.20: | Radiochemische Inkorporation bei einem Volumen von 5 bzw. 30 µL unter Temperierung des Produktsammelgefäßes auf 60°C bzw. ohne Temperierung | 44 |
| Abb. 2.21: | Grafische Darstellung der einzelnen Versuche der Verdünnungsreihe mit DMSO als Lösungsmittel | 46 |
| Abb. 2.22: | Grafische Darstellung der einzelnen Versuche der Verdünnungsreihe mit HPLC-Laufmittel als Lösungsmittel | 46 |
| Abb. 2.23: | Vergleich der radiochemischen Inkorporationen mit bzw. ohne Druckregulation bei unterschiedlichen Durchflussgeschwindigkeiten ... | 47 |
| Abb. 2.24: | DC-Chromatogramm einer Synthese mit DMF als Lösungsmittel | 48 |
| Abb. 2.25: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Temperatur bei unterschiedlichen Precursor-Konzentrationen (2, 3 und 4 mg/mL); Versuche durchgeführt am 20.04.2011 | 50 |
| Abb. 2.26: | Radiochemische Inkorporation in Abhängigkeit von der Temperatur bei unterschiedlichen Precursor-Konzentrationen (2, 3 und 4 mg/mL); Versuche durchgeführt am 16.05.2011..... | 51 |
| Abb. 2.27: | Schematische Darstellung des Set-ups des GETracerlab F _X F _N | 56 |

| | | |
|------------|---|----|
| Abb. 2.28: | DC- Chromatogramm des geschnittenen [¹⁸ F]Fluorid-Peaks (präp. HPLC-Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2, Flow: 5 mL/min) | 58 |
| Abb. 2.29: | DC-Chromatogramm des formulierten [¹⁸ F]Altanserin-Peaks (präp. HPLC-Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2, Flow: 5 mL/min) | 59 |
| Abb. 2.30: | HPLC-Chromatogramm des geschnittenen [¹⁸ F]Fluorid-Peaks (präp. HPLC-Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2, Flow: 5 mL/min) | 59 |
| Abb. 2.31: | HPLC-Chromatogramm des formulierten [¹⁸ F]Altanserin-Peaks (präp. HPLC-Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH:73/10.8/16.2, Flow: 5 mL/min) | 60 |
| Abb. 2.32: | Standardgerade von Altanserin | 61 |
| Abb. 2.33: | HPLC-Chromatogramm der Standards Altanserin und Nitroaltanserin unter Verwendung des Laufmittels NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 55/18/27 (Flow: 5 mL/min) | 62 |
| Abb. 2.34: | HPLC-Chromatogramm der Standards Altanserin und Nitroaltanserin unter Verwendung des Laufmittels NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 66.5/13.5/20 (Flow: 5 mL/min) | 62 |
| Abb. 2.35: | HPLC-Chromatogramm der Standards Altanserin und Nitroaltanserin unter Verwendung des Laufmittels NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2 (Flow: 5 mL/min) | 62 |
| Abb. 2.36: | Präparative HPLC-Aufreinigung von [¹⁸ F]Altanserin (Säule: Chromolith SemiPrep RP-18e, Laufmittel: NaOAc 0.05N pH 5/THF/MeOH: 73/10.8/16.2, Durchflussgeschwindigkeit: 5 mL/min) | 63 |
| Abb. 2.37: | Radiochemische Inkorporationsraten der drei Proben nach 0, 5, 15, 30, 45 und 60 Minuten (UV= unverdünnt, HPLC= mit analytischem HPLC-LM verdünnt, PRÄP = mit präparativem HPLC-LM verdünnt) | 64 |
| Abb. 2.38: | Präparative HPLC-Aufreinigung von [¹⁸ F]Altanserin (Säule: ProntoSIL 120 C18 ace-EPS, Laufmittel: AcN/0.1% TEA pH 6.8: 45/55, Durchflussgeschwindigkeit: 20 mL/min) | 66 |
| Abb. 2.39: | Präparative HPLC-Aufreinigung von [¹⁸ F]Altanserin (Säule: Gemini C18, Laufmittel NH ₄ OAc 24 mmol pH 5.4/AcN: 82.5/17.5, Durchflussgeschwindigkeit: zw. 5 mL/min und 13 mL/min) | 68 |

D Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| Tab. 2.1: | Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Masterclean“ | 25 |
| Tab. 2.2: | Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Concentratorclean“ | 25 |
| Tab. 2.3: | Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Azeotropic drying“ | 27 |
| Tab. 2.4: | Programmierter Code zur Ausführung des Macros „Temperature control“ | 30 |
| Tab. 2.5: | Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Load“ | 31 |
| Tab. 2.6: | Programmierte Codes zur Ausführung des Makros „Reaction“ | 31 |
| Tab. 2.7: | Abhängigkeit der Precursor-Konzentration in Reaktionslösung vom Verhältnis Pumpe 1: Pumpe 3 | 34 |
| Tab. 2.8: | Radiochemische Inkorporationen in Abhängigkeit der Verdünnung der Reaktionslösung mit DMSO bzw. HPLC-Laufmittel | 45 |
| Tab. 2.9: | Verbliebende Radioaktivität nach der Synthese von [¹⁸ F]Altanserin | 51 |
| Tab. 2.10: | Vergleich der verwendeten HPLC-Laufmittel und –säulen der angeführten Arbeitsgruppen [84] | 53 |
| Tab. 2.11: | Verluste an Radioaktivität während der ersten Stationen der präparativen Auftrennung, ausgehend von der Aktivität des Syntheseprodukts (383.4 MBq) | 65 |
| Tab. 2.12: | Auflistung der verwendeten präparativen HPLC-Säulen und Laufmittel, der eingesetzten Durchflussgeschwindigkeiten sowie der entsprechenden Retentionszeiten von [¹⁸ F]Altanserin | 69 |

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sandra Richter
Adresse: Hockegasse 6/6
1180 Wien
Geburtsdatum: 02.01.1985
Geburtsort: Wien
Nationalität: Österreich
Familienstand: ledig



Ausbildung

| | |
|--------------|--|
| 1991 - 1995 | Volksschule Scheibenbergstraße (Wien) |
| 1995 - 2003 | Bundesgymnasium Klostergasse (Wien) Abschluss: Matura mit gutem Erfolg im Juni 2003 |
| Seit WS 2003 | Studium der Pharmazie an der Universität Wien |

Berufserfahrungen

| | |
|------------------------|--|
| Juni 2003 – April 2012 | Geringfügig Beschäftigte beim FWF (Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung) |
| Juli 2006 | Ferialpraktikum bei „Octapharma Pharmazeutika ProduktionsgesmbH“ |
| August 2006 | Ferialpraktikum bei „Haydn-Apotheke“ (1050 Wien) |
| Juli 2008 | Ferialpraktikum bei „Adler-Apotheke“ (1180 Wien) |
| August 2009 | Ferialpraktikum bei „Adler-Apotheke“ (1180 Wien) |
| Juli 2010 | Ferialpraktikum bei „Adler-Apotheke“ (1180 Wien) |

Sprachkenntnisse

| | |
|-------------|---------------|
| Deutsch | Muttersprache |
| Englisch | Schulniveau |
| Französisch | Schulniveau |
| Latein | Schulniveau |

Wien, März 2012